

B~

Especificación del patrón morfogenético en la región dorsocentral del tórax de *Drosophila*.

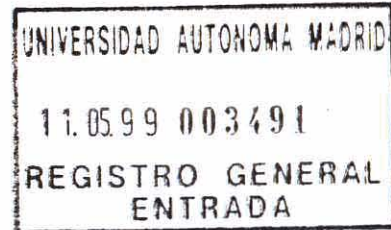
Memoria presentada por
María Jesús García García para optar
al grado de Doctora en Ciencias por
la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Mayo de 1999.

SC
1995

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA MOLECULAR

**Especificación del patrón
morfogenético
en la región dorsocentral del tórax de
Drosophila.**



Director: Dr. Juan Modolell Mainou
Tutora: Dra. Sonsoles Campuzano Corrales

María Jesús García García
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM
Madrid, Mayo, 1999

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
El patrón de quetas de <i>Drosophila</i> y los genes proneurales	1
Regulación de la expresión de los genes <i>ac</i> y <i>sc</i>	5
Controladores directos de los enhancers del CAS:	
el complejo génico Iroquois	6
Prepatrón en la región DC: los genes <i>pnr</i> y <i>ush</i>	6
Prepatrón en la región DC: el gen <i>wingless</i>	10
El prepatrón temprano y las relaciones entre genes de prepatrón	12
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Estirpes de <i>Drosophila</i>	16
Generación de clones de células mutantes	16
Sobrexpresión de genes por el método GAL4-UAS	16
Histoquímica	16
Construcción de transgenes y transformación de embriones	17
Técnicas de ADN recombinante	17
Secuenciación de ADN	18
Rastreo en genotecas de expresión	18
Mutagénesis dirigida	18
Experimentos de transfección y ensayos CAT	19
Ensayos de EMSA	19
DISCUSIÓN	21
PARTE I: CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS ENHANCER DEL CAS.	21
Delimitación de la región enhancer ANP-APA, tr1, tr2-GSR-Tgd-Rd.	21
Secuencia de los enhancers para los grupos proneurales ANP, APA- tr1-tr2, GSR, Tgd y Rd	23
Delimitación del enhancer dorsocentral	24
El enhancer DC dirige niveles de expresión heterogéneos en las células del grupo proneural DC	25
El enhancer DC contiene motivos de unión para factores de transcripción	27
Conservación evolutiva de la secuencia del enhancer DC	27
PARTE II: REGULACIÓN DEL ENHANCER DC POR EL PREPATRÓN DEL DISCO IMAGINAL.	29
CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE <i>pnr</i> y <i>wg</i>.	29
Pnr es un activador transcripcional en la región DC	29
Pnr interacciona directamente con el enhancer DC	30
La proteína Wg es necesaria para la actividad del enhancer DC	32
La expresión espacialmente restringida de la proteína Wg no determina la localización del grupo proneural DC	33

Los componentes intracelulares de la vía de transducción de Wg probablemente actúan sobre el enhancer DC	33
Contribución relativa de Pnr y Wg a la expresión dirigida por el enhancer DC	35
PARTE III: OTROS ELEMENTOS DEL PREPATRÓN.	
REGULACIÓN ENTRE LOS GENES DE PREPATRÓN.	37
Pnr activa y reprime a <i>wg</i> en el primordio de notum	37
PARTE IV: PREPATRÓN PARA EL GRUPO PRONEURAL DC EN EL EJE ANTERO-POSTERIOR.	39
Dpp afecta la expresión de DC- <i>lacZ</i> , así como el prepatrón general del disco imaginal	39
DISCUSIÓN	43
Los enhancers del CAS para la expresión en grupos proneurales dirigen niveles de expresión heterogéneos entre las células de un mismo grupo	44
Análisis de las secuencias correspondientes a los enhancers de los grupos proneurales DC, ANP, APA-tr1-tr2, Tgd, Rd y GSR	45
Pnr se une al enhancer DC y regula directamente su actividad	46
Pnr y Ush definen la localización del grupo proneural DC en el eje dorso-lateral	46
Control del enhancer DC por la vía de Dpp	48
Regulación entre Pnr, Ush y <i>wg</i>	49
Jerarquía de los genes de prepatrón en la región DC	51
CONCLUSIONES	53
Anexo I	54
BIBLIOGRAFÍA	55

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo ontogénico de los organismos pluricelulares es indispensable una coordinación entre los procesos de crecimiento y diferenciación celulares. Así, a medida que se produce un incremento en el número de células, por división sucesiva del cigoto, las células hijas van adquiriendo unas determinadas características regionales que determinarán su destino final en el organismo adulto. La adquisición de dichas características está determinada genéticamente, de manera que el resultado final de la ontogénesis produce un organismo semejante a sus progenitores y distinto a organismos de otras especies, con dotación genética diferente.

El término prepatrón fue introducido por Curt Stern en 1954 para explicar conceptualmente algunos de los mecanismos de diferenciación que operan durante el desarrollo. Según Stern, la diferenciación es el resultado de la respuesta de genes específicos a prepatrones específicos. Dichos prepatrones comenzarían elaborándose en el citoplasma del huevo en forma de interacciones entre características regionales y los genes que responden a ellas, y seguirían evolucionando hasta la determinación de las estructuras adultas mediante interacciones sucesivas entre genes que forman el prepatrón, genes que responden al prepatrón y genes que pueden modificar prepatrones existentes (Stern, 1954). Así pues, para comprender el desarrollo de las estructuras adultas de un organismo es necesario averiguar cuál es el entramado de genes durante la diferenciación.

La Genética del Desarrollo tiene como objetivo dilucidar cuáles son los genes de un organismo que dan cuenta de los diferentes mecanismos de diferenciación y cómo operan dichos genes. Para ello se han escogido varios organismos, representantes de varios niveles de la escala evolutiva, como modelos de experimentación.

Resulta interesante observar que muchos de los mecanismos de diferenciación están conservados entre especies relativamente distantes, así como también lo están, a nivel molecular, los genes implicados en dichos procesos. Sin embargo en otros casos, genes con homología estructural han sido reclutados en distintas especies para procesos de diferenciación diferentes (revisado en Duboule y Wilkins, 1998). Por lo tanto, puede pensarse que las diferencias morfológicas finales entre organismos distintos radican en pequeñas diferencias en la dotación genética que producen una diferente coordinación de las interacciones entre los genes que participan en los procesos de desarrollo (Jacob, 1977). A este respecto cabe destacar la importancia de las interacciones entre regiones enhancer, encargadas de la regulación espacio/temporal de la transcripción génica, y los reguladores transcripcionales que se unen a ellas, ya que pequeños cambios en estas regiones enhancer pueden determinar

drásticas variaciones en la expresión de los genes bajo su control, y por lo tanto, en los procesos de diferenciación en los que estos intervienen (Davidson, 1993).

En el presente trabajo hemos utilizado *Drosophila melanogaster* para el estudio de las interacciones génicas involucradas en la elaboración de prepatrones. En concreto, nos hemos centrado en el estudio de el/los prepatrón/es necesarios para la diferenciación del sistema nervioso periférico (SNP) de la mosca adulta, y en cómo estos prepatrones interaccionan con los elementos enhancer que participan en la especificación del patrón del SNP.

El patrón de quetas de *Drosophila* y los genes proneurales.

Los individuos adultos de *D. melanogaster* tienen en su epidermis abundantes quetas y otras sensilas que forman parte de su SNP. Estos órganos sensoriales (OSs) se distribuyen formando un patrón reproducible entre los distintos individuos de la especie. En cada heminotum se encuentran 11 macroquetas y dos sensilas tricoideas (dos tipos de OS externos mecanorreceptores) que aparecen en posiciones invariables, y además, unas 100-125 microquetas (otro tipo de OS) que se distribuyen formando filas y conservando una densidad aproximadamente constante (Fig. 1A; García-Bellido, 1983). Cada uno de estos OS está compuesto por varias células que derivan de una única célula precursora común, la célula madre del órgano sensorial (CMOS), la cual mediante dos o más divisiones diferenciales dará lugar a los componentes del OS en el adulto (Bate, 1978; Bodmer y cols., 1989; Hartenstein y Posakony, 1989). La localización de los OS en la cutícula adulta está especificada durante el tercer estadio larvario y el comienzo del estadio pupal por la posición en la que se diferencia la CMOS en el disco imaginal de ala-notum (Cubas y cols., 1991; Huang y cols., 1991), la estructura precursora de la epidermis del mesotórax y del ala. (Fig. 1B)

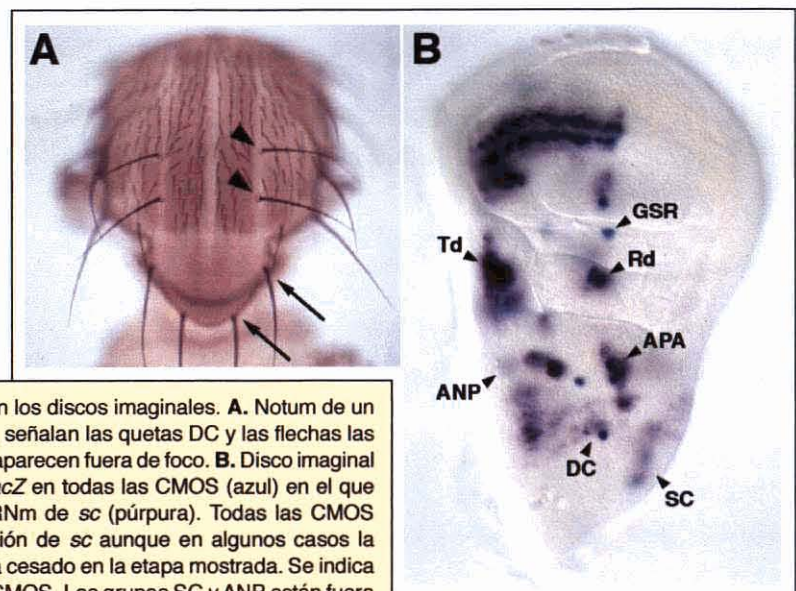


Figura 1. El patrón de OSs se especifica en los discos imaginales. **A.** Notum de un adulto de *Drosophila*. Las puntas de flecha señalan las quetas DC y las flechas las escutelares. Las quetas de la región lateral aparecen fuera de foco. **B.** Disco imaginal de ala de la línea A101.1F3 que expresa *lacZ* en todas las CMOS (azul) en el que también se muestra la distribución del ARNm de *sc* (púrpura). Todas las CMOS aparecen dentro de los grupos de expresión de *sc* aunque en algunos casos la expresión de *sc* en el grupo proneural ya ha cesado en la etapa mostrada. Se indica el nombre de algunos grupos proneurales/CMOS. Los grupos SC y ANP están fuera de foco. (Tomado de Campuzano y Modolell, 1992).

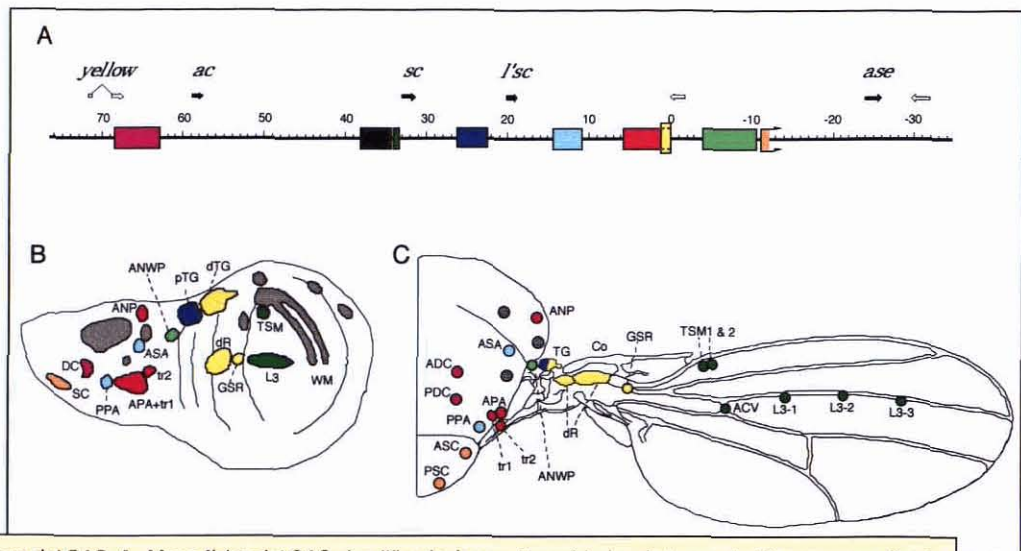


Figura 2. Los enhancers del CAS. **A.** Mapa físico del CAS simplificado, las cuatro unidades de transcripción correspondientes a los genes proneurales del CAS se representan como flechas negras y las correspondientes a otros genes como flechas huecas. Las cajas representan regiones de ADN que contienen enhancers para los grupos proneurales (cajas coloreadas) o para las CMOS (caja negra). **B.** Esquema de un disco imaginal de ala en el que se ilustran los grupos proneurales. **C.** Esquema de un heminotum y ala en el que se muestra la localización de algunos OSs (círculos). Los colores en A se corresponden con los de los grupos proneurales en B y los OSs en C. (Modificado de Gómez-Skarmeta y cols., 1995).

El análisis genético señaló a los genes *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*), miembros del complejo génico *achaete-scute* (CAS), como esenciales para la generación de la mayor parte de los OS externos (García-Bellido y Santamaría, 1978; García-Bellido, 1979; García-Bellido, 1981). En los mutantes de falta de función de estos genes faltan grupos de OS de manera específica para cada alelo (García-Bellido, 1979; Ruiz-Gómez y Modolell, 1987; Leyns y cols., 1989), mientras que en los mutantes de exceso de función (mutaciones *Hairy-wing*, *Hw*) se forman OSs adicionales en posiciones ectópicas (García-Bellido y Santamaría, 1978; García-Alonso y García-Bellido, 1986; Balcells y cols., 1988). El análisis genético y molecular del CAS mostró que este complejo comprende unas 90 kb de ADN e identificó físicamente los cuatro genes involucrados en neurogénesis: *ac*, *sc*, *lethal of scute* (*l'sc*) y *asense* (*ase*) (Fig. 2) (García-Bellido, 1979; Ghysen y Richelle, 1979; Jiménez y Campos-Ortega, 1979; Carramolino y cols., 1982; Campuzano y cols., 1985; Romani y cols., 1987; Villares y Cabrera, 1987; Alonso y Cabrera, 1988; Brand y cols., 1993; Domínguez y Campuzano, 1993). Estos genes codifican factores de transcripción con un dominio básico-hélice-lazo-hélice (bHLH) (Villares y Cabrera, 1987; Alonso y Cabrera, 1988; González y cols., 1989; Martín-Bermudo y cols., 1995), implicado en la formación de heterodímeros con otras proteínas y en el reconocimiento de secuencias de ADN denominadas motivos E con secuencia CANNTG (Ephrussi y cols., 1985; Murre y cols., 1989; Cabrera y Alonso, 1991; Ohsako y cols., 1994). Se ha demostrado que las proteínas del CAS pueden formar heterodímeros con la proteína Daughterless (*Da*) (Caudy y cols., 1988) y de este modo pueden activar la transcripción de genes necesarios para la diferenciación de las CMOS (Mlodzik y cols., 1990; Cabrera y Alonso, 1991; Van Doren y cols., 1992; Ohsako y cols., 1994; Singson y cols., 1994; Culí y Modolell, 1998).

Los genes *ac* y *sc* se coexpresan en grupos de células que ocupan posiciones específicas dentro de los discos imaginales (Fig. 1B), (Romani y cols., 1989; Cubas y cols., 1991; Skeath y Carroll, 1991). Este patrón de expresión restringido determina la posición en la que se diferenciarán las CMOS. Así, en moscas mutantes *ac*³, una condición que elimina la expresión de *ac* y *sc* en el grupo proneural dorsocentral (DC), solamente se afecta el desarrollo de las quetas DC (Cubas y cols., 1991; Martínez y Modolell, 1991; Skeath y Carroll, 1991). Por otro lado, la sobreexpresión generalizada de los genes *ac* y *sc* en los discos imaginales, ya sea mediante mutaciones *Hw* (Campuzano y cols., 1986; Balcells y cols., 1988) o mediante el uso de transgenes (HS-*sc*; Rodríguez y cols., 1990), produce la diferenciación de OS en posiciones ectópicas. Por esta razón, los genes *ac* y *sc* se denominan genes proneurales, y grupos proneurales las regiones del disco imaginal que expresan estos genes (Ghysen y Dambly-Chaudière, 1989; Romani y cols., 1989).

Si bien la expresión de *ac* y *sc* en los grupos proneurales restringe la localización en la que se determinarán las CMOS dentro del disco imaginal, no todas las células del grupo proneural se diferencian como CMOS. La selección de las células que darán lugar a las CMOS dentro de los grupos proneurales tiene lugar mediante mecanismos de comunicación intercelular que se han denominado de inhibición lateral (Simpson, 1990). Dentro de cada grupo proneural se crean heterogeneidades que determinan la mayor expresión de los genes proneurales en unas pocas células del grupo, las cuales adquieren una mayor capacidad de inhibir en sus células vecinas el devenir CMOS. Esta inhibición mutua entre las células del grupo proneural sólo permite que una o dos células, dependiendo del grupo proneural, devengan CMOS (revisado en Ghysen y Dambly-Chaudière, 1993). Las interacciones celulares que median este proceso se llevan a cabo por los llamados genes neurogénicos, entre los que cabe destacar la proteína transmembrana Delta, implicada en la emisión de la señal inhibidora, y el receptor de dicha señal, Notch. La interacción Delta-Notch activa una vía de transducción intracelular, siendo los efectores finales de dicha vía los productos de los genes del complejo *Enhancer of split* (*E(spl)*) (revisado en Artavanis-Tsakonas y cols., 1995). Los genes *E(spl)* codifican factores de transcripción del tipo prolinea-bHLH (Preiss y cols., 1988; Knust y cols., 1992) que actúan como represores transcripcionales (Oellers y cols., 1994) mediante su unión a secuencias específicas CACGCG y CACGAG, llamadas motivos N (Ohsako y cols., 1994). Recientemente se han encontrado motivos N en el enhancer de *sc* que controla su expresión en las CMOS, y se ha propuesto que dicha unión actuaría bloqueando la expresión de *sc*, y por lo tanto, impidiendo la diferenciación neural en las células del grupo que son inhibidas mediante la vía de inhibición lateral (Culí y Modolell, 1998).

Regulación de la expresión de los genes *ac* y *sc*.

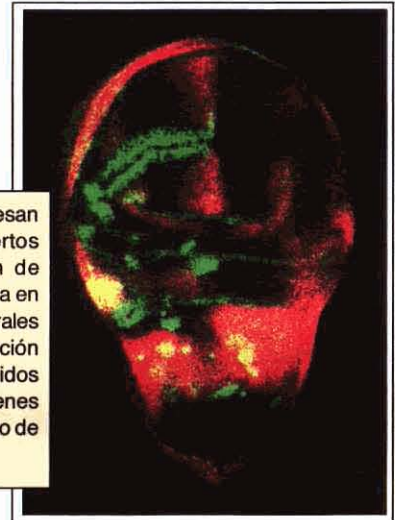
La expresión de *ac* y *sc* en los grupos proneurales depende de una batería de elementos reguladores de tipo “enhancer” que se encuentran en las regiones no transcritas del CAS (Fig. 2). La existencia de dichos enhancers se dedujo gracias al estudio de los fenotipos debidos a mutaciones en el CAS asociadas a roturas cromosómicas. En una colección de mutantes con roturas cromosómicas distribuidas a lo largo de 50 kb proximalmente al gen *sc* se observó que a medida que el punto de ruptura se acercaba al gen *sc*, se eliminaban progresivamente un mayor número de quetas de posiciones específicas (Campuzano y cols., 1985). De modo similar, mutaciones con puntos de ruptura distales al gen *ac* afectaban al patrón de OS de manera progresiva (Ruiz-Gómez y Modolell, 1987; Leyns y cols., 1989). Los fenotipos de estas mutaciones se atribuyeron a su capacidad para separar físicamente los genes *ac* y *sc* de las secuencias de ADN responsables de su activación (Ruiz-Gómez y Modolell, 1987). Estos datos sugirieron la existencia de al menos una región enhancer para la expresión de *ac* y *sc* en cada uno de los grupos proneurales, y permitieron acotar la localización de algunas de dichas regiones enhancer. La capacidad enhancer de estas regiones se comprobó posteriormente mediante ensayos de transformación en *Drosophila* (Fig. 2; Martínez y Modolell, 1991; Gómez-Skarmeta y cols., 1995). Así, un fragmento de 5.7 kb situado en la región 5' del gen *ac* (caja morada en la Fig. 2) dirigió la expresión del gen marcador *lacZ* en el grupo proneural DC; otro fragmento de 0.76 kb (caja verde en la Fig. 2) lo hacía en los grupos proneurales de la vena 3 y de la sensila gemela del margen del ala (TSM); y otro fragmento de unas 6 kb (cajas amarilla y roja en la Fig. 2) contenía el enhancer para la expresión en los grupos proneurales para la macroqueta anterior notopleural (ANP), para la macroqueta anterior postalar y las sensilas tricoideas 1 y 2 (APA-tr1,2), para la sensila gigante del radio (GSR), para la sensila de la tégula distal (Tgd) y para la sensila del radio dorsal (Rd).

Dado que los enhancers controlan la expresión de los genes proneurales y estos, en definitiva, determinan el patrón de OS de la mosca adulta, los responsables últimos de dicho patrón serán los factores que regulen la actividad de las regiones enhancer. Actualmente se asume que los enhancers del CAS responden a una combinatoria local específica de factores de transcripción que forman un prepatrón en el disco imaginal (Stern, 1954; Simpson, 1996; Modolell y Campuzano, 1998). Se supone que estos factores de transcripción estarían presentes en los discos imaginales en dominios de expresión más amplios que los de los grupos proneurales, y que solamente en los sitios con la combinación adecuada de factores, se produciría la expresión de los genes proneurales. Hasta el momento, solo se conocen unos pocos genes cuyas propiedades sugieren fuertemente su función como genes de prepatrón (Simpson, 1996; Modolell y Campuzano, 1998). Este es el caso de los genes *Iroquois* (*Iro*) y de los genes *pannier* (*pnr*) y *u-shaped* (*ush*). Sin embargo solamente en el caso de las proteínas del complejo *Iroquois* se ha demostrado una interacción directa con los enhancers del CAS.

Controladores directos de los enhancers del CAS: el complejo génico Iroquois.

El complejo Iro se identificó genéticamente gracias al fenotipo del mutante *iro*¹, en el cual todas las quetas de la región lateral del notum están ausentes, así como también lo está la expresión de *ac-sc* en los grupos proneurales correspondientes (Dambly-Chaudière y Leyns, 1992; Leyns y cols., 1996). El análisis molecular de esta región reveló la existencia de varios genes: *araucan* (*ara*), *caupolicán* (*caup*) y *mirror* (*mirr*), que codifican factores de transcripción del grupo de las homeoproteínas y presentan un dominio involucrado en la activación transcripcional (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; McNeill y cols., 1997). El patrón de expresión de los genes Iro en los discos imaginales es restringido y solapante con varios de los grupos proneurales, tal y como se ilustra en la Fig. 3 (Gómez-Skarmeta y cols., 1996). Dicho patrón de expresión es decisivo para la correcta especificación espacial de los OS de la mosca (Gómez-Skarmeta y Modolell, 1996).

Figura 3. Los genes Iro se expresan en un patrón solapante con ciertos grupos proneurales. El patrón de expresión de *ara* y *caup* se muestra en rojo. Algunos de los grupos proneurales de Sc (mostrados en verde por tinción con anticuerpo anti Sc) están incluidos en la región de expresión de los genes Iro y aparecen en amarillo. (Tomado de Gómez-Skarmeta y cols., 1996).



Se ha demostrado que las homeoproteínas Iro pueden unirse a elementos enhancer del CAS y que dicha unión es crítica para la actividad de dichos enhancers. En efecto, la proteína Ara se une *in vitro* a secuencias TAAT presentes en el enhancer para el grupo proneural L3, y la mutagénesis de estas secuencias en el elemento enhancer elimina por completo su capacidad de dirigir la expresión génica en el grupo proneural L3 (Gómez-Skarmeta y cols., 1996).

Prepatrón en la región DC: los genes *pnr* y *ush*.

El locus *pnr* se identificó inicialmente por los fenotipos de falta de función para este gen en el desarrollo de la cutícula larvaria dorsal (Jürgens y cols., 1984). Posteriormente, una mutagénesis exhaustiva del locus reveló su función en el desarrollo de OS, específicamente en las regiones DC y escutelar (SC) (Romain y cols., 1993; Heitzler y cols., 1996). Así, de una colección de 25 alelos mutantes, algunas combinaciones alélicas como *pnr*^{D1}/*pnr*^{V1} producían un desarrollo de OS ectópicos en la región DC mientras que otras, como *pnr*^{VX1}/*pnr*^{V1} producían la ausencia de dichos OS (Fig. 4A y C; Romain y cols., 1993). Estos fenotipos de OS se debían a una alteración del patrón

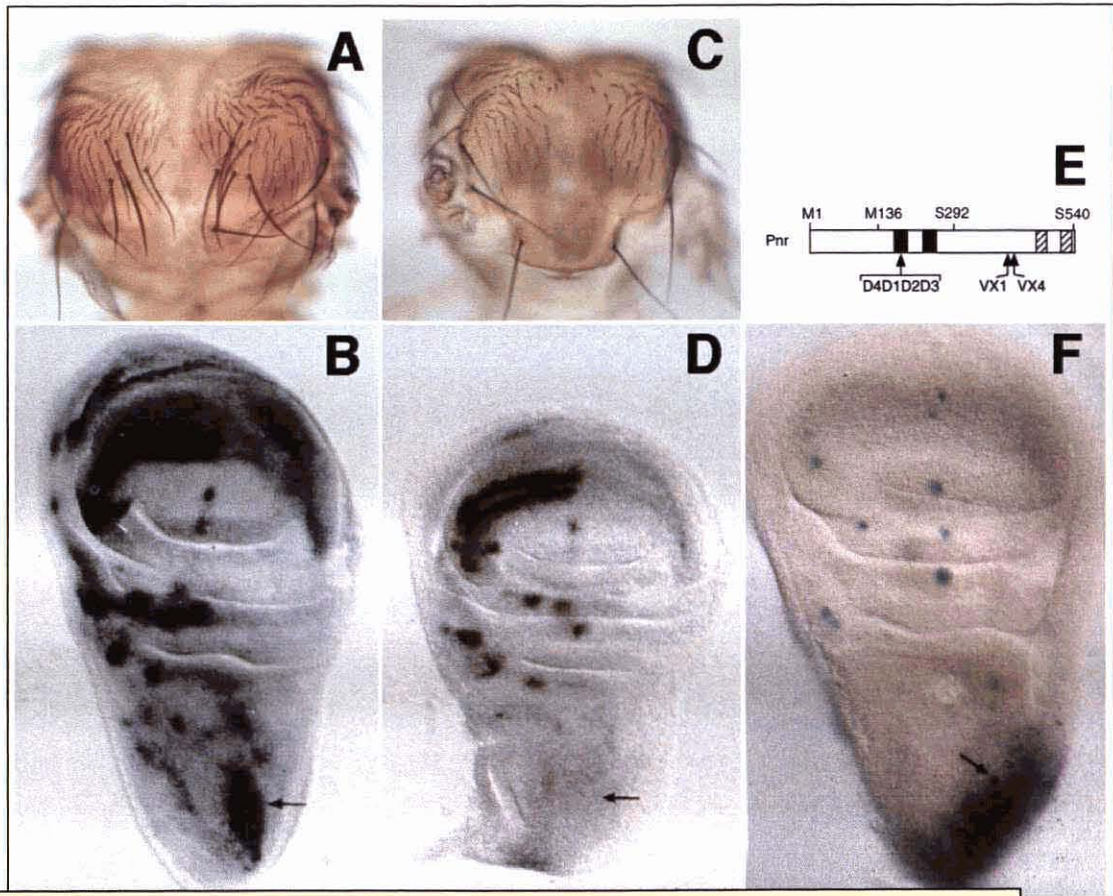


Figura 4. Pnr participa en la especificación de la región DC del tórax. Nota y discos imaginales de las combinaciones alélicas *pnr^{D1}/pnr^{V1}* (A-B) y *pnr^{VX1}/pnr^{V1}* (C-D). C y D están teñidos con anticuerpo específico anti Ac. La flecha señala la posición del grupo proneural DC, que resulta expandido o eliminado en las combinaciones respectivas. E. Estructura de la proteína Pnr: los dominios dedo de Zinc se representan como cajas negras y las α -hélices anfipáticas como cajas rayadas. Las flechas muestran la posición de las mutaciones asociadas a los alelos *pnr^D* (sustituciones puntuales) y a los alelos *pnr^{VX}* (sustituciones que introducen un codón prematuro de parada de traducción). F. Patrón de expresión de *pnr* en discos imaginales revelado por hibridación *in situ* con sonda marcada con digoxigenina (púrpura). La expresión es máxima en la zona dorsal y decae progresivamente hacia la zona lateral del disco. La flecha indica la posición de una CMOS DC, revelada por tinción del

de expresión de los genes proneurales, que resultaba expandido o eliminado específicamente de la región DC en los mutantes correspondientes (Fig. 4B y D; Romain y cols., 1993). La caracterización molecular del locus reveló que codificaba una proteína con dos hélices α anfipáticas y con dos dominios de tipo dedos de Zinc con alta homología a los de la familia de reguladores transcripcionales GATA-1 (Fig. 4E; Evans y cols., 1988; Romain y cols., 1993; Winick y cols., 1993). Las proteínas de esta familia, como el factor GATA-1 de pollo, activan la transcripción mediante el reconocimiento, por parte de su dominio con dedos de Zinc, de secuencias específicas A/TGATAA/G (Evans y cols., 1988). Por tanto, el gen *pnr* parecía un buen candidato a regular la expresión de los genes proneurales. Además, el patrón de expresión de *pnr* en discos imaginales es restringido (Fig. 4F), expresándose en altos niveles en la región más dorsal del disco y decreciendo gradualmente hacia la región lateral, aproximadamente hasta la altura del grupo proneural DC (Romain y cols., 1993). Estos datos llevaron a proponer una función represora de *pnr* sobre la expresión de los genes proneurales (Romain y cols., 1993). Sin embargo una serie de experimentos *in vitro* diseñados

para analizar la función de Pnr como regulador transcripcional, así como un estudio más profundo de la naturaleza molecular de los alelos mutantes para este gen, demostraron que la proteína Pnr es un activador transcripcional (Haenlin y cols., 1997).

La proteína Pnr, tal y como se demostró mediante un experimento de selección de oligonucleótidos, reconoce en el ADN secuencias GATAAG (Haenlin y cols., 1997). Estas secuencias son similares a las reconocidas por el factor GATA-1 de pollo en el promotor para la α -globina (Evans y Felsenfeld, 1991). Por ello Haenlin y col. analizaron la capacidad de Pnr para unirse a dicho elemento regulador y, así, utilizar este sistema para estudiar la función de Pnr como factor de transcripción. De este modo se comprobó que la unión específica de Pnr al ADN activa la transcripción génica (Haenlin y cols., 1997). Dicha activación está mediada por las dos hélices α C-terminales de Pnr, ya que las proteínas mutantes Pnr^{VX}, que carecen de estas dos hélices α (Fig. 4E), no activan la transcripción, a pesar de tener intacto su dominio N-terminal de interacción con el ADN (Haenlin y cols., 1997). La ausencia del dominio activador en estas proteínas explica por qué los mutantes *pnr*^{VX} se comportan *in vivo* como alelos de falta de función, provocando la ausencia de OS en la región DC (Fig. 4C; Romain y cols., 1993).

Sin embargo, los fenotipos dominantes de ganancia de función producidos por los alelos *pnr*^D no se explican por el comportamiento *in vitro* de estas proteínas. Las proteínas mutantes Pnr^D, caracterizadas por tener sustituciones puntuales en el dedo de Zinc N-terminal (Fig. 4E, (Romain y cols., 1993), se unen *in vitro* al promotor de la α -globina y desencadenan una activación génica similar a la de la proteína Pnr intacta (Haenlin y cols., 1997). Cabe preguntarse por tanto qué función desempeña el dedo de Zn N-terminal de la proteína Pnr y cómo se explican los fenotipos de OS extra asociados a los alelos *pnr*^D (Fig. 4B). La explicación se obtuvo al caracterizar el gen *ush* (Cubbada y cols., 1997).

El locus *ush* se identificó gracias a la interacción de sus mutaciones con las mutaciones *pnr*^D. Las mutaciones hipomorfas *ush* aumentan el fenotipo de extraquetas de las mutaciones *pnr*^D. Además, las mutaciones *ush* afectan al desarrollo de las quetas DC y SC, las mismas que son afectadas por las mutaciones *pnr* (Fig. 5A; Cubbada y cols., 1997). Así, las combinaciones viables hipomorfas *ush* producen la diferenciación de CMOS extra en la región DC (Fig. 5B), mientras que una sobreexpresión del transgén *UAS-ush* elimina las CMOS del grupo proneural DC (Fig. 5C). Por tanto, *ush* parece actuar como un regulador negativo de la expresión de los genes proneurales, en contraposición a *pnr*, que actúa como un activador de dichos genes (Cubbada y cols., 1997). El patrón de expresión de *ush* en discos imaginales comprende un dominio dorsal en el notum similar al de *pnr*, un dominio en la región de la axila alar, y una franja en la región posterior de la pleura (Fig. 5D). La caracterización molecular de este locus reveló que *ush* codifica una proteína con varios motivos Cys2-His2 y

Cys₂-His-Cys, una región ácida y varias regiones con repeticiones de alanina (Cubbada y cols., 1997). Los dominios Cys₂-His₂ como los Cys₂-His-Cys forman estructuras del tipo dedos de Zinc. Los primeros son similares a los de la familia de factores de transcripción ZFY, mientras que los segundos, pese a parecerse a los encontrados en varias proteínas, no tienen una función conocida (Cubbada y cols., 1997). Dado que la localización subcelular de esta proteína es nuclear y que presenta motivos similares a los de otros factores de transcripción, es probable que Ush funcione como un factor de transcripción. Sin embargo en diferentes ensayos, Ush no ha revelado ninguna capacidad para unirse de manera específica al ADN (Cubbada y cols., 1997). Así pues, resulta improbable que Ush sea un represor directo de la expresión de los genes proneurales. El hecho de que las mutaciones *ush* interaccionen fuertemente con los alelos mutantes de *pnr*, así como la similitud entre los patrones de expresión de estos dos genes, hizo pensar en una posible interacción entre las proteínas Pnr y Ush. En efecto, Haenlin y cols., demostraron que el dedo de Zinc N-terminal de la proteína Pnr interviene en la formación de heterodímeros con la proteína Ush (Haenlin y cols., 1997). Además observaron que, en ensayos *in vitro* con el promotor de la α -globina en células de pollo, Ush puede interferir con la capacidad activadora de Pnr. Las proteínas Pnr^D, que tienen mutaciones en el dedo de Zinc N-terminal, no forman heterodímeros con Ush. Por ello, estas formas mutantes no pueden ser antagonizadas por Ush en ensayos *in vitro* (Haenlin y cols., 1997), ni tampoco *in vivo*, razón por la cual los mutantes *pnr*^D se comportan como alelos dominantes de ganancia de función (Romain y cols., 1993; Haenlin y cols., 1997).

En base a la interacción Pnr-Ush y a los fenotipos observados en las combinaciones mutantes para alelos *pnr* y *ush*, el grupo de Patricia Simpson propuso un modelo para

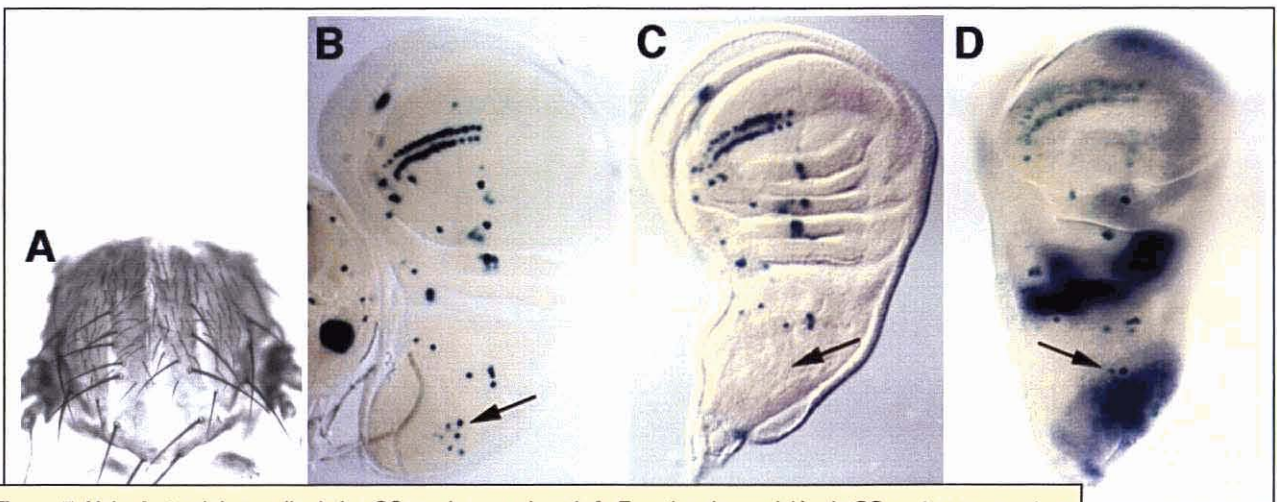


Figura 5. Ush afecta el desarrollo de los OSs en la zona dorsal. **A.** Fenotipo de aparición de OSs extra en un notum de la combinación *ush^{rev24}/ush⁻*. **B y C** Discos imaginales de genotipos *ush^{SW42}/ush^{TgR+1}* (condición hipomorfa) y *UAS-ush; pnr^{MD237}*, respectivamente (la línea *pnr^{MD237}* es una inserción de un elemento P-GAL4 en el locus *pnr*). Las flechas indican la diferenciación de CMOS ectópicas en la región DC (B) o su desaparición (C), reveladas por tinción del marcador A101.1F3. **D.** Disco imaginal teñido para *ush* mediante hibridación *in situ* con sonda marcada con digoxigenina (púrpura) y para el marcador A101.1F3 (azul). La flecha indica la posición de las CMOS DC (Tomado de Cubbada y cols., 1997).

explicar el papel que desempeñan estos genes en la especificación de la región DC. Este modelo asume que la expresión de *ush*, en un dominio ligeramente más restringido que el de *pnr* en la zona dorsal, define una banda en el notum en la cual la proteína Pnr no está titulada por su antagonista Ush y puede así activar la transcripción de genes necesarios para la especificación de la región DC (Cubbada y cols., 1997; Haenlin y cols., 1997). Los genes *ac* y *sc*, por tanto, podrían estar controlados directa o indirectamente por Pnr, es decir, Pnr podría regular la expresión génica mediante su unión al elemento enhancer para la expresión en el grupo proneural DC, o *ac* y *sc* podrían estar regulados por otros genes bajo el control directo de Pnr.

Prepatrón en la región DC: el gen *wingless*.

El gen *wingless* (*wg*), que codifica un homólogo del oncogén Wnt-1, interviene en diferentes procesos de diferenciación durante el desarrollo embrionario y larvario de *Drosophila* (revisado en Klingensmith y cols., 1994). Entre ellos, interviene en la especificación de OSs en la región DC del notum puesto que mutaciones *wg* de falta de función eliminan específicamente las quetas DC, SC y APA (Couso y cols., 1993; Phillips y Whittle, 1993). Esta alteración está acompañada de una ausencia de expresión de *ac* (y probablemente también *sc*) en los grupos proneurales correspondientes de los discos imaginales (Phillips y Whittle, 1993).

wg comienza a expresarse en el territorio precursor del notum en los discos imaginales de tercer estadio larvario temprano. Inicialmente la expresión de *wg* ocupa la región más dorsal del notum (Fig. 6A) y más tarde se restringe a una banda antero-posterior situada aproximadamente en la mitad del notum (Fig. 6B), justamente colindando dorsalmente con la posición del grupo proneural DC (Couso y cols., 1993; Phillips y Whittle, 1993). Esta posición, así como el hecho de que Wg se requiera para la diferenciación de las quetas DC, ha llevado a proponer que la expresión restringida de *wg* en los discos imaginales es una clave posicional para la expresión de los genes proneurales (Phillips y Whittle, 1993; Tomoyasu y cols., 1998).

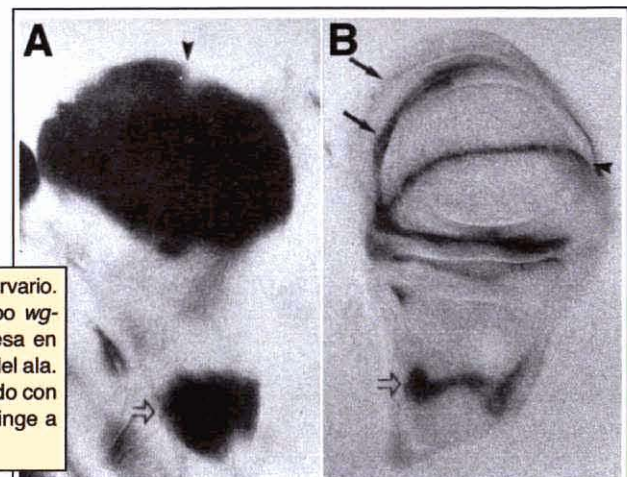


Figura 6. Patrón de expresión de *wg* a lo largo del tercer estadio larvario. **A.** Disco imaginal de tercer estadio larvario temprano y genotipo *wg-lacZ*, teñido por reacción histoquímica con X-Gal. *wg* se expresa en casi todo el territorio precursor del notum (flecha) y en la región del ala. **B.** Disco imaginal de 120 h después de la puesta del huevo teñido con anticuerpo anti Wg. En la zona del notum la expresión se restringe a una banda antero-posterior (Tomado de Couso y cols., 1993).

wg codifica una proteína secretable que participa en procesos de comunicación intercelular (Baker, 1987; Nusse y Varmus, 1992). Un cierto número de evidencias sugieren que Wg actúa como un morfógeno (Lawrence y Struhl, 1996) revisión). Es decir, las regiones de expresión de *wg* en los discos imaginales serían orígenes de formación de gradientes de proteína Wg que serían informativos para las células del disco, las cuales expresarían unos u otros genes dependiendo de la concentración de Wg que recibieran, y por tanto, de su posición con respecto al gradiente. Así, en el territorio precursor del ala, se conocen genes que se expresan a las altas concentraciones de proteína Wg del territorio adjacente al margen del ala, entre ellos las proteínas proneurales (Phillips y Whittle, 1993; Couso y cols., 1994); y genes que responden a niveles más bajos de Wg en zonas más alejadas del margen, como por ejemplo el gen *Distalless* (Zecca y cols., 1996; Neumann y Cohen, 1997). En el territorio precursor del notum, Wg podría también actuar como morfógeno con respecto a la expresión *ac* y *sc* en el grupo proneural DC (Phillips y Whittle, 1993; Tomoyasu y cols., 1998), activándose estos a altas concentraciones de proteína Wg, tal y como ocurre en el margen del ala. Se ha sugerido que dicha activación podría estar mediada por el elemento enhancer para la región DC (Tomoyasu y cols., 1998). De ser así, la recepción de la señal de Wg debería redundar en la activación de algún factor de transcripción capaz de reconocer secuencias presentes en el enhancer DC.

Recientemente se han descrito componentes de la vía de transducción intracelular de Wg que tienen actividad como reguladores transcripcionales (Brunner y cols., 1997; van de Wetering y cols., 1997). Según el modelo actual de funcionamiento de esta vía de transducción, la interacción de Wg con su receptor determina la estabilización de la proteína codificada por el gen *armadillo/β-catenin* (*arm*), un proceso mediado por una cascada de fosforilaciones en la que participan varios genes conocidos (revisado en Orsulic y Peifer, 1996)). La estabilización de Arm conlleva un aumento de los niveles de esta proteína en el núcleo, donde puede unirse al factor *dTCF/pangolin* (*dTCF/pan*) formando un heterodímero capaz de activar la transcripción (Riese y cols., 1997; van de Wetering y cols., 1997). La especificidad de unión al ADN de este dímero radica en el dominio HMG de la proteína dTCF, que reconoce secuencias CCTTTGA/TA/T, mientras que Arm provee la capacidad de activar la transcripción a través de su dominio C-terminal (van de Wetering y cols., 1997). Ya se han identificado varios sitios de unión para dTCF en promotores de genes que responden a la vía de Wg (Florence y cols., 1997; Riese y cols., 1997). Así pues, la regulación de la expresión de los genes proneurales en la región DC por parte de Wg, podría estar mediada por la unión directa de dTCF al enhancer que controla la expresión en el grupo proneural DC.

El prepatrón temprano y las relaciones entre genes de prepatrón.

El patrón de expresión restringido de los genes *lro*, *pnr*, *ush* y *wg*, en discos imaginales de la tercera fase larvaria, contribuye a explicar la expresión de *ac* y *sc* en los grupos proneurales, y ésta a su vez, el patrón de quetas en los individuos adultos. Ahora bien, cabe preguntarse cuales son las claves posicionales que permiten la expresión restringida de los genes de prepatrón, es decir, cuales son los genes responsables del prepatrón temprano necesario para el establecimiento de prepatrones posteriores.

El desarrollo de cada disco imaginal de ala comienza cuando un grupo de células del ectodermo embrionario, en una posición que está determinada por la expresión de los genes *wg* y *decapentaplegic* (*dpp*, un homólogo del factor TGF- β de vertebrados), segrega del resto de las células que darán lugar a la epidermis del embrión (Bate y Martínez-Arias, 1991; Cohen y cols., 1993). Estos grupos, de tan solo unas decenas de células, poseen ya algunas heterogeneidades posicionales que heredan de su localización en el ectodermo embrionario (Martínez-Arias, 1993). Así, hay células que expresan el gen homeótico *engrailed* (*en*), y que darán lugar al compartimento posterior del disco (Kornberg y cols., 1985). La expresión de *en* determina así una de las primeras distinciones entre dos poblaciones celulares del disco imaginal y, además, determina una restricción de linaje que se mantiene a lo largo del crecimiento del disco imaginal (Morata y Lawrence, 1975; Kornberg y cols., 1985; Blair, 1992; Tabata y cols., 1995; Zecca y cols., 1995). La presencia de dicha restricción de linaje antero/posterior (A/P) se observó por primera vez al generar clones de recombinación mitótica favoreciendo la proliferación de las células del clon mediante el uso de mutaciones *Minute* (García-Bellido y cols., 1973; García-Bellido y cols., 1976). Este análisis también determinó la existencia de otros bordes de restricción de linaje que surgen posteriormente al borde A/P durante el crecimiento del disco, como el borde dorso/ventral (D/V) y el borde ala/notum (García-Bellido y cols., 1976; González-Gaitán y cols., 1994). Algunos de estos bordes de restricción de linaje también se han podido relacionar con la expresión diferencial de genes, por ejemplo, el borde D/V se genera durante el primer/segundo estadio larvario gracias a la expresión restringida del gen *apterous* en las células del compartimento dorsal (Cohen y cols., 1992; Díaz-Benjumea y Cohen, 1993; Blair y cols., 1994).

Se ha comprobado que la generación de bordes de restricción es un mecanismo importante en morfogénesis, ya que no sólo contribuyen a establecer diferencias entre poblaciones celulares, sino que además estos bordes actúan como centros organizadores que controlan el crecimiento y la formación de prepatrones en regiones muy extensas del disco (Meinhardt, 1983; Blair, 1995). Esto último se logra mediante la activación, en las células del borde, de genes que desempeñan un papel determinante en dicho crecimiento, y en la adquisición por las células del disco de distintas características según su posición respecto al borde.

En el caso del borde A/P, las células del compartimento posterior expresan la proteína secretable Hedgehog (Hh) que difunde hacia las células del compartimento anterior en donde antagoniza la función del gen *patched* (*ptc*) e inicia una cascada de transducción de señal en la que participan los genes *smoothed*, *fused*, *PKA*, *costal-2*, *slimb* y *cubitus-interruptus* (*ci*) (revisado en Ingham, 1998). *ci* codifica una proteína que se procesa de manera dependiente de Hh y que se comporta como un factor de transcripción activador, en presencia de señalización por Hh, o represor, en ausencia de señal (Aza-Blanc y cols., 1997; Méthod y Basler, 1999). De este modo, Ci activa, en una franja colindante al borde A/P, la expresión de varios genes (Capdevila y Guerrero, 1994; Tabata y Kornberg, 1994; Zecca y cols., 1995). Entre estos genes se encuentra *dpp*, que codifica una proteína secretable que difunde a partir del borde A/P, y crea un gradiente de concentración capaz de determinar la activación de varios genes actuando como un morfógeno (de Celis y cols., 1996; Grimm y Pflugfelder, 1996; Lecuit y cols., 1996; Nellen y cols., 1996; Kim y cols., 1997).

En el caso del borde D/V, la expresión de *ap*, a través de la vía de Notch, determina la activación de *wg* (Fig (Díaz-Benjumea y Cohen, 1995; Kim y cols., 1995; Rulifson y Blair, 1995; Panin y cols., 1997). Así se crea una fuente de proteína Wg en el borde de compartimento y un gradiente de concentración de dicha proteína, que actuaría como morfógeno activando la expresión de distintos genes en células distantes (Zecca y cols., 1996; Neumann y Cohen, 1997; Cadigan y cols., 1998).

En el territorio precursor del ala, como resultado de la división del disco en compartimentos y de la capacidad organizadora de éstos, se activan una serie de genes que subdividen el territorio en dominios más restringidos y participan en la diferenciación de dichas regiones (de Celis y cols., 1996; Grimm y Pflugfelder, 1996; Lecuit y cols., 1996; Nellen y cols., 1996; Kim y cols., 1997; Neumann y Cohen, 1997; Cadigan y cols., 1998). Entre estos genes, se encuentran los genes del complejo Iro, ya que su expresión en el territorio de la vena 3 está controlada por la acción coordinada de las proteínas En, Wg, Ci y Dpp (Gómez-Skarmeta y Modolell, 1996). Para el caso del territorio precursor del notum se asume que estas y posiblemente otras claves posicionales tempranas determinan la activación de los genes de prepatrón. Sin embargo, actualmente se tiene poca evidencia de que esto ocurra así, y se desconocen, en su mayor parte, las interacciones que tienen lugar entre los genes que se expresan en el territorio precursor del notum.

No obstante, una de las interacciones conocidas entre las claves posicionales tempranas y los genes del prepatrón es la regulación de la banda de expresión de *wg* por la vía de Dpp. (Morimura y cols., 1996) y (Tomoyasu y cols., 1998) suponen una función represora de la vía de Dpp sobre *wg*, ya que condiciones de falta de función para la vía de Dpp producen la expansión de la banda de Wg (Fig. 7A), mientras que esta aparece disminuida o interrumpida en condiciones de ganancia de función para

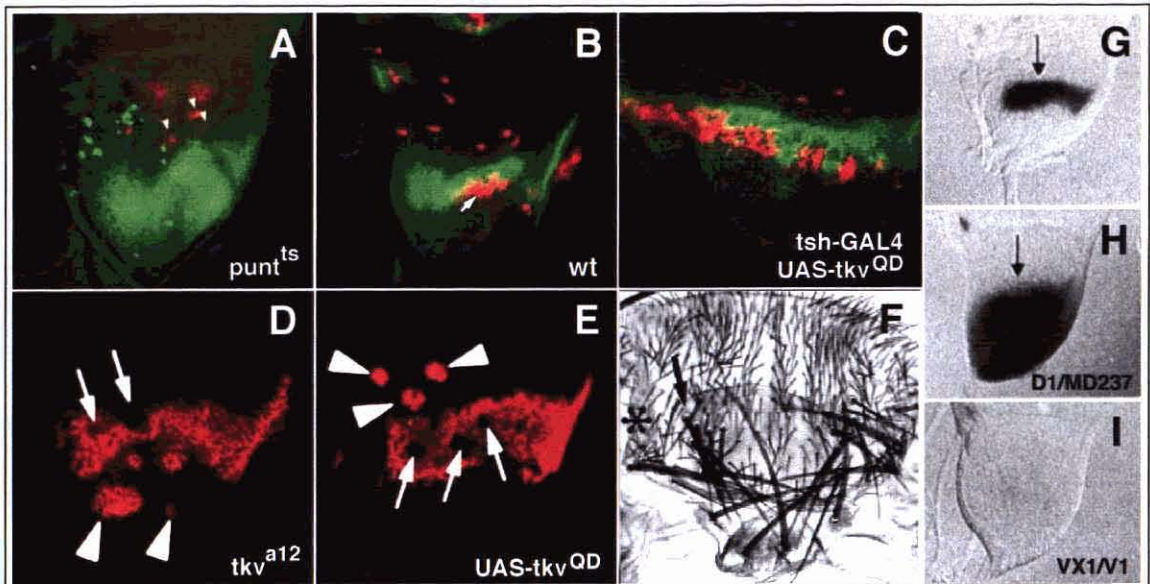


Figura 7. Relaciones entre los genes de prepatrón en el notum. **A-C** Discos imaginales de genotipos: *punt*^{P1}/*punt*¹³⁵; 3.7 *sc-lacZ* (crecido a temperatura restrictiva 29°C) (**A**); 5.7kb *DC-lacZ* (**B**) y 5.7kb *DC-lacZ/tsh-GAL4; UAS-tkv*^{QD} (**C**). [*punt* codifica el receptor para *dpp* de tipo II (Letsou y cols., 1995) y *UAS-tkv*^{QD} una forma constitutivamente activa de *tkv*]. En verde se muestra la expresión de Wg revelada mediante un anticuerpo específico, y en rojo la expresión de *lacZ* dirigida por los transgenes correspondientes (en las CMOS en **A**; y en las CMOS y el grupo DC en **B-C**). (Tomado de Tomoyasu y cols., 1998). **D-E** Discos imaginales *wg-lacZ* teñidos con anticuerpo anti β-galactosidasa en los que se han generado clones de falta de función para *tkv* (**D**, alelo *tkv*^{a12}) o de sobreexpresión de *UAS-tkv*^{QD} (**E**). Las puntas de flecha indican clones en los que *wg* se activa ectópicamente, y las flechas clones que suprimen la expresión de *wg* (Tomado de Sato y cols., 1999). **F** Fenotipo de OSs extra en moscas del genotipo *c765 UAS-dpp*^s crecidas a 17°C (Tomado de Mullor y cols., 1997). **G-I** Expresión de *wg-lacZ* en discos imaginales silvestres, *pnr*^{D1}/*pnr*^{MD237} y *pnr*^{VX1}/*pnr*^{V1}, respectivamente (Tomado de Calleja y cols., 1996).

la vía de Dpp (Fig. 7C; (Morimura y cols., 1996; Tomoyasu y cols., 1998). Sin embargo, experimentos recientes realizados por Sato y cols. (1999) muestran que la regulación de Wg por Dpp debe ser más complicada, puesto que clones de falta de función o de ganancia de función para *thick veins* (*tkv*), el receptor para Dpp de tipo I, tienen diferentes efectos sobre la expresión de Wg dependiendo de la zona del disco imaginal en las que se encuentre el clon (Fig. 7D y E; (Sato y cols., 1999). También se ha sugerido que las vías de transducción de Dpp y de Hh podrían formar parte del prepatrón para los genes proneurales, ya que la alteración de estas vías afecta a la especificación de las quetas en la región DC (Fig. 7F; (Mullor y cols., 1997), así como a la expresión de marcadores para las CMOS y para el grupo proneural DC (Fig. 7C; (Tomoyasu y cols., 1998).

También se ha descrito que existe una regulación entre los propios genes de prepatrón que se expresan en el notum. La banda de expresión de *wg* se altera drásticamente en combinaciones mutantes para el gen *pnr* (Fig. 7G-I; (Calleja y cols., 1996), así como en mutaciones *Iro* (Diez del Corral, 1998), y también algunas mutaciones *pnr* alteran la expresión de los genes *Iro* (Diez del Corral, R., no publicado). Así pues, el prepatrón en el territorio precursor del notum parece que se establece y mantiene durante el desarrollo, gracias a interacciones entre genes de prepatrón temprano y los genes de prepatrón tardío, así como mediante interacciones entre estos últimos. Sin embargo, actualmente el entramado de regulaciones génicas que permite el establecimiento de las claves posicionales en el territorio precursor del notum de los discos imaginales es casi completamente desconocido.

OBJETIVOS

Uno de los objetivos que se persiguen en nuestro laboratorio es el estudio de la formación de los patrones del disco imaginal de ala, entre ellos el que contribuye a definir el patrón de expresión altamente regionalizado de los genes *ac* y *sc*. Dado que la expresión de estos genes en los grupos proneurales se consigue gracias a una serie de elementos enhancer, en el presente trabajo nos propusimos utilizar algunos de estos enhancers como herramienta para el estudio de sus interacciones con los factores constituyentes del prepatrón. Así, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Delimitar y caracterizar en mayor profundidad dos de los elementos enhancer del CAS que promueven la expresión en grupos proneurales específicos.
- Secuenciar los fragmentos mínimos con actividad enhancer.
- Obtener el máximo de información posible acerca de los factores que se unen directamente a los enhancers y regulan así su actividad.
- Determinar si genes del prepatrón conocidos participan directa o indirectamente en la regulación de la expresión génica mediada por los enhancers.
- Analizar la contribución relativa de los diferentes genes del prepatrón conocidos a la activación de los genes proneurales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estirpes de *Drosophila*.

La descripción de las mutaciones *pnr* puede encontrarse en (Heitzler y cols., 1996), y la de las mutaciones *ln(1)sc^{10.1}* y *ry⁵⁰⁶* en (Lindsley y Zimm, 1992). El alelo *wg^{CX4}* es un mutante nulo para *wg* (Baker, 1987) y *wg^{CX3}* es una mutación de la zona reguladora que elimina la expresión en los discos imaginales (Baker, 1988).

Estirpes para la generación de clones: *yFLP122* (Struhl y Basler, 1993), *2πMyc FRT40A FRT82B πMyc* (Xu y Rubin, 1993).

Líneas activadoras GAL4: *c734* y *c765* (Gómez-Skarmeta y cols., 1996), *pnr^{MD237}* (Heitzler y cols., 1996), *dpp-GAL4* (Staehling-Hampton y cols., 1994).

Líneas UAS: *UAS-wg* (Lawrence y cols., 1995), *UAS-arms¹⁰* y *UAS-dTCF^{DN}* (van de Wetering y cols., 1997), *UAS-pnr* (Haenlin y cols., 1997), *UAS-dpp^w* (expresión débil) y *UAS-dpp^s* (expresión fuerte) (Mullor y cols., 1997), *UAS-tnv^{QD}* (Nellen y cols., 1996).

Generación de clones de células mutantes.

La recombinación mitótica fue inducida por el método hsFLP/FRT descrito en (Golic y Lindquist, 1989). Larvas de los genotipos *yFLP*; *wg^{CX4} ck FRT40A/ 2πMyc FRT40A*; *AS1.4DC/balaceador* o *yFLP*; *AS1.4DC/+*; *FRT82B kar² ry⁵⁰⁶ pnr^{VX6} / FRT82B πMyc* se sometieron a choque térmico (1 h a 37°C) para inducir la recombinación a las 24-48 y 48-72 horas después de la puesta del huevo, respectivamente. Para inducir la transcripción del marcador *Myc* se dio un segundo tratamiento de choque térmico dos horas antes de la fijación.

Sobrexpresión de genes por el método GAL4-UAS.

El método GAL4-UAS (Brand y Perrimon, 1993) permite la sobreexpresión controlada de genes. Para ello se utilizan dos tipos de cepas de *Drosophila* transgénicas. Unas expresan el factor de transcripción de levaduras GAL4 en patrones espaciales determinados (líneas activadoras) y las otra poseen el transgén que se quiere sobreexpresar bajo el control de un promotor que contiene elementos UAS, secuencias de ADN a las que se une la proteína GAL4 (líneas efectoras). Mediante un cruce entre una cepa activadora y otra efectora se obtienen en la descendencia individuos que poseen una copia de ambos tipos de transgenes, de manera que se logra la expresión del transgén de interés en el patrón de la línea activadora.

Histoquímica.

La expresión de *lacZ* dirigida por los transgenes se analizó por tinción con X-Gal (Gómez-Skarmeta y cols., 1995) o por tinción con anticuerpo de ratón anti β-galactosidasa (1/700 Promega) revelado con anti ratón-HRP (Amersham). La señal revelada por estas

tinciones aparece en las figuras en color azul o marrón respectivamente. Las tinciones con anticuerpos se hicieron como en Cubas y cols.(1991). Los anticuerpos utilizados fueron: anti β -galactosidasa (1/200 Promega o 1/2000 Cappel), anti c-Myc (1/1500 Mab9E10 Babco), anti Wg (1/10 Mab4E6 (Brook y Cohen, 1996), anti Sc (1/2000 cedido por S. Carroll), anti Caup (1/200 P.Aroca no publicado), anti ratón-FITC (Jackson) y anti conejo-LRSC (Jackson). Para la adquisición de las imágenes con fluorescencia en el microscopio confocal (LSM310 Zeiss), las muestras se montaron en un medio con Mowiol (Sigma).

Las hibridaciones *in situ* a discos imaginales se realizaron esencialmente según (Tautz y Pfeifle, 1989) con las modificaciones descritas en Cubas y cols.(1991) y utilizando sondas de ARN o ADN marcadas con digoxigenina preparadas con los ADNc de *pnr*, *wg* y *dpp* (kit de marcaje de Boehringer Mannheim). La señal revelada por este tipo de tinción aparece en las figuras en color púrpura.

Construcción de transgenes y transformación de embriones.

Para preparar los transgenes con el promotor de *sc* (P0.8DC, P1.8DC, AX2.3DC, C1.65DC, H1.0ANP, H1.2ANP y HC3.5ANP) los fragmentos correspondientes se clonaron en el plásmido 3.7*sc*-pHSS7 (Martínez y Modolell, 1991), y luego fragmentos NotI de estas construcciones, que contenían el subfragmento correspondiente y la secuencia líder 3.7*sc*, se clonaron en el plásmido pLac20 (Schröder y cols., 1988) que permite la transformación en *Drosophila*. Para preparar el transgén PB0.5DC+*sc*, se insertó un fragmento ClaI de aprox. 1 kb que contenía el promotor de *sc* y el enhancer para los grupos proneurales L3 y TSM.a continuación del fragmento PB0.5DC. Posteriormente el fragmento resultante se clonó en el plásmido pLac20. Para preparar los transgenes con el promotor *hsp70* (ANP-A, ANP-B, ANP-C, ANP-D, ANP-E, ANP-F, AS1.4DC, SX0.9DC, SC0.5DC, AP0.5DC, P0.5DC y PB0.5DC) los fragmentos correspondientes se clonaron en el plásmido HZ50PL (Hiromi y Gehring, 1987). Las delecciones terminales del fragmento HC3.5ANP se realizaron en pBluescript (Stratagene) tal como se describe en (Sambrook y cols., 1989).

La transformación de embriones se realizó a 18°C según se describe en (Rubin y Spradling, 1982) y (Roberts, 1986). En todos los casos, la cepa receptora fue *ry⁵⁰⁶*, y la mezcla de ADN contenía 0.3 mg/ml del transgén correspondiente más 0.15 mg/ml de pUCHs π Δ 2-3 (Misra y Rio, 1990) como fuente de transposasa.

Técnicas de ADN recombinante.

La purificación de ADN procedente de bacterias y de bacteriófagos, los ensayos de hibridación con sondas de ADN, las digestiones, ligaciones, transformaciones y selección de plásmidos transformantes se hizo según (Sambrook y cols., 1989).

Las condiciones utilizadas en los experimentos de hibridación a baja estrictancia fueron:

- Hibridación durante toda la noche a 37°C en 5xSSPE, 5x Denhardt, 0.1%SDS, 200 µg/ml ADN de esperma de salmón, 43% formamida.
- Tres lavados a 37°C de 30 min. cada uno en 0.2xSSPE, 0.2%SDS. Las sondas se marcaron con [α-³²P]dCTP usando el kit Rediprime (Amersham).

Secuenciación de ADN.

La secuenciación se realizó mediante el sistema de secuenciación automática basado en el kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer). El ensamblaje y análisis de las secuencias se realizó mediante los programas GCG de la Universidad de Wisconsin (Devereux y cols., 1984) y con el programa Seqman II (DNASTar Inc.). La comparación de las secuencias de *D. melanogaster* y *D. virilis* se hizo con el programa Dotter.

Rastreo en genotecas de expresión.

La búsqueda en genotecas de expresión se realizó como se describe en (Kalionis, 1995). Se utilizó una genoteca de ADNc de embriones de *Drosophila* de 9-12 h construida en el vector λgt11 (Zinn y cols., 1988). Como sonda se utilizó el fragmento PB0.5DC marcado mediante PCR con las siguientes condiciones: 100 µM d(A,G,T)TP, 10 mM dCTP, 5 µl [α-³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM oligonucleótidos cebadores. La reacción de PCR se realizó en 25 ciclos de amplificación del tipo: 96°C 15 seg., 55°C 1 min., 72°C 3 min.

Mutagénesis dirigida.

La mutagénesis de las cajas GATA se realizó con el kit Muta-Gene Phagemid *in vitro* mutagénesis kit (BioRad) usando como molde la construcción AS1.4DC-pBluescript. Las versiones mutadas se secuenciaron para comprobar las mutaciones introducidas, y luego se clonaron en el plásmido HZ50PL para su transformación en *Drosophila*. Para los ensayos de CAT en células embrionarias de pollo, fragmentos PstI-Sall de las versiones mutadas se introdujeron en el plásmido AdhCAT.

Las mutaciones introducidas en las cajas GATA se diseñaron considerando los resultados de (Evans y Felsenfeld, 1991). En todos los casos los nucleótidos GAT se cambiaron por CTG. En algunos casos se introdujeron mutaciones adicionales en nucleótidos adyacentes tal como sigue:

GATA₁ 276-TTAACTGCAGAGT; GATA₂ 525-AGGCAGCTGAGAGA;
GATA₃ 943-TTCGCTGATCGAT; GATA₄ 978-AAAGCTGAATTC;
GATA₅ 1177-TGACCTGAATTCC; GATA₆ 1242-AGAAAGCTTCAGGTC;
GATA₇ 1347-GTGGATCCAGTTAA.

La mutagénesis de la caja TAAT se realizó sustituyendo esta región por otra rica en nucleótidos G-C, tal como sigue: 1253-CGTCATGGTGCGGCCGCAAGGTTATTCT

Los números indican la posición de la secuencia según la numeración de la Fig. 12. Los nucleótidos subrayados indican la posición del núcleo GATA o TAAT. Los nucleótidos mutados están en negrita.

Experimentos de transfección y ensayos CAT.

Estos experimentos fueron realizados por Philippe Romain tal como se describe en Haenlin y cols. (1997). Los vectores CAT utilizados en estos experimentos contenían el fragmento AS1.4DC, subfragmentos de este, versiones mutadas (descritas anteriormente) o un tándem de 5 copias de los oligonucleótidos:

TCGGTAATTATTCAGTGCCTTATCTTAAAGACTTTCTGAC para 5x(GATA₇)^{wt}AdhCAT
TCGGTAATTATTCAGTGCCTT**CAG**TTAAAGACTTTCTG para 5x(GATA₇)^{mut}AdhCAT

Ensayos de EMSA.

Los ensayos de retardo con la proteína Pnr se realizaron por Philippe Romain tal como se describe en Haenlin y cols. (1997). Las proteínas fusión GST-PnrDBD1 (Ala124-Ser292) y GST-PnrDBD2 (Ala124-Gly387) se expresaron en *E. coli*, se purificaron y se utilizaron en el EMSA utilizando las siguientes sondas (solo se especifica una de las hebras):

263-CCAAAACAAATATTAAGATAAAAGTCAGTGGGGACT-299 para GATA₁;
263-CCAAAACAAATATTA**CTG**AAAAGTCAGTGGGGACT-299 para GATA_{1mut};
1337-TAATTATTCAGTGCCTTATCTTAAAGACTTTCTGAC-1372 para GATA₇ y
1337-TAATTATTCAGTGCCTT**CAG**TTAAAGACTTTCTGAC-1372 para GATA_{7mut}.

Los números indican la posición de la caja GATA según la numeración de la Fig. 12. Los nucleótidos subrayados indican la posición del núcleo GATA. Los nucleótidos mutados están en negrita.

Para los ensayos de retardo con la proteína dTCF, se clonó en la fase de lectura correcta un fragmento de PCR con la zona codificante para el dominio HMG de dTCF (Leu206-Ser411) en el plásmido pGEX-3X (Smith y Johnson, 1988). La proteína de fusión se expresó en la cepa BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) y se purificó tal como se describe en Smith y Johnson (1988), con las modificaciones descritas en (Ip y cols., 1992). Las sondas se sintetizaron y marcaron por PCR añadiendo 2 µl [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) a la mezcla de reacción (0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 µM oligonucleótidos cebadores). Como ADN molde se utilizó AS1.4DC-pBluescript y los oligonucleótidos cebadores fueron: ACCGCAGCAGTTCATTCA y pBluescript KS para la sonda 1; TTTCCGGCGCAAATGC y TAGATTGGACTGCAAGTGC para la sonda 2; y GGCGATACCCCTTCC y CGGCCGCAATGTTATCC para la sonda 3. Como sonda

control se uso el oligonucleótido GGATCCGCAC**CCCTTTGATCTTTT**CTGGATC de doble cadena marcado en sus extremos. Este oligonucleótido contiene (negrita) el consenso para la unión de dTCF descrito en van de Wetering y cols. (1997). Las combinaciones adecuadas de cada sonda y las cantidades de proteína descritas en cada caso se mezclaron en el tampón 10 mM HEPES (pH 7.9), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 EDTA, 5% glicerol, 0.07 mg/ml de poli(dl-dC) de doble hebra y 0.5 mM espermidina. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, 10 µl de los 15 µl del volumen de la reacción se cargaron en un gel de poliacrilamida al 4%(30 acrilamida/1bisacrilamida).

RESULTADOS

PARTE I

CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS ENHANCER DEL CAS.

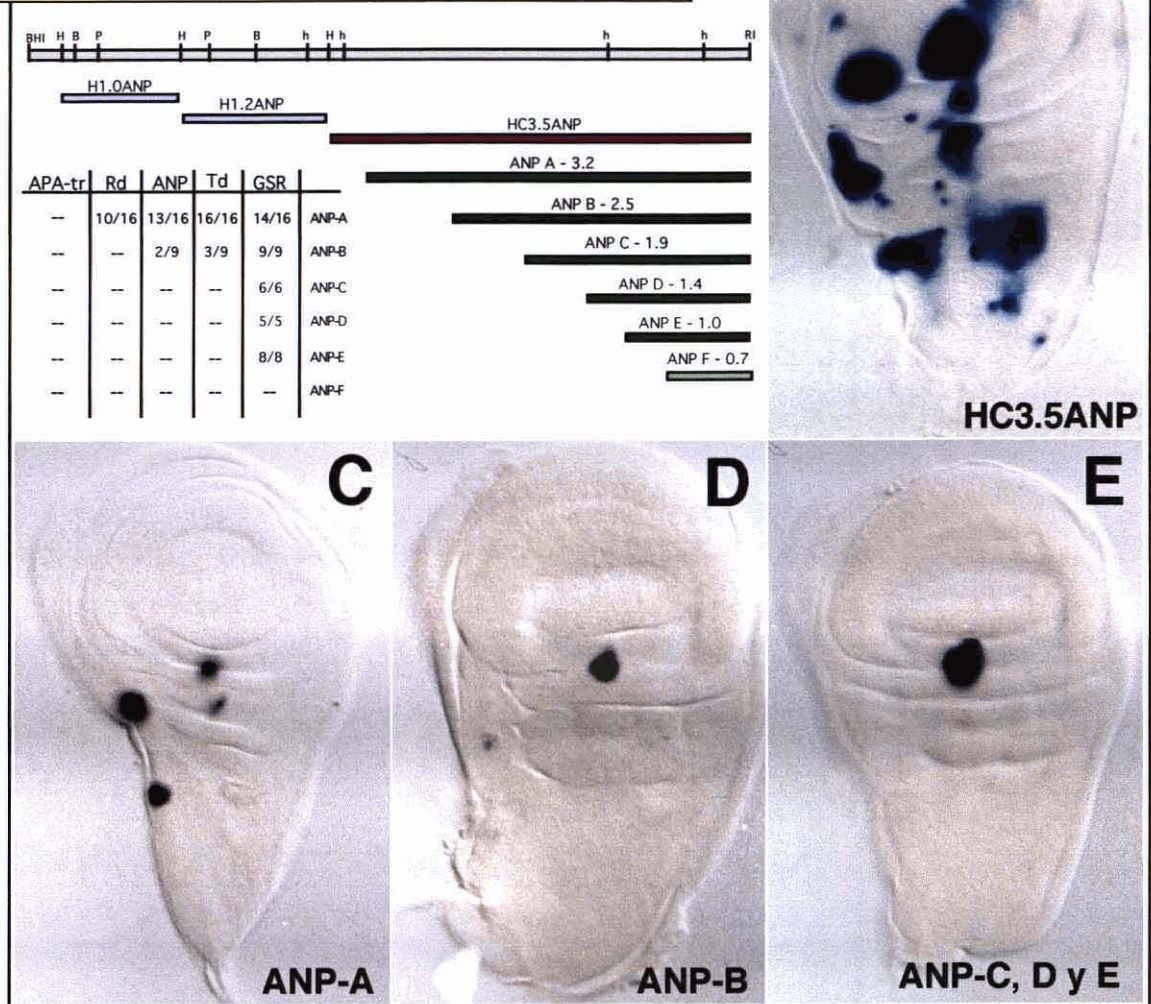
Los elementos enhancer presentes en el CAS controlan el complejo patrón espacial y temporal de expresión de los genes proneurales y, de este modo, dirigen los procesos que dan lugar a la localización precisa de los elementos sensoriales en la mosca adulta. Por ello, el primer objetivo de nuestro trabajo fue delimitar y caracterizar dos regiones con actividad enhancer previamente identificadas en nuestro laboratorio (Gómez-Skarmeta y cols., 1995). Una de ellas, localizada en las coordenadas 68.6-62.9 según el mapa de la Fig. 2, dirigía la expresión en el grupo proneural DC. La otra, localizada en las coordenadas 6.0-0.0, dirigía la expresión en los grupos proneurales ANP, APA-tr1,2, GSR, Tgd y Rd (Fig. 2).

La existencia de estas regiones con actividad enhancer se dedujo a partir de datos genéticos y se comprobó posteriormente mediante ensayos de transformación en *Drosophila* (Gómez-Skarmeta y cols., 1995). Estos ensayos consisten en obtener individuos transformantes de *Drosophila* que contengan un transgén con la secuencia a ensayar situada junto a un promotor basal que dirige la expresión de un gen marcador (como el gen *lacZ* de *E. coli*). La presencia de elementos enhancer en la secuencia se comprueba mediante la detección de un patrón de expresión específico del gen marcador en los tejidos de los individuos transformantes. Con esta técnica definimos las regiones enhancer hasta las secuencias mínimas necesarias para la actividad enhancer, ensayando la capacidad de distintos subfragmentos para dirigir la expresión del gen marcador *lacZ* en los grupos proneurales respectivos. Usamos dos tipos de transgenes que se diferenciaban en el promotor que controlaba la expresión de *lacZ*. Uno de ellos, contenía el promotor para el gen *sc* (promotor homólogo) y además enhancers que dirigen la expresión en las CMOS y en los grupos proneurales TSM y L3 (Martínez y Modolell, 1991). El otro tipo de transgén, contenía el promotor basal de las proteínas de choque térmico *hsp70*.

Delimitación de la región enhancer ANP-APA, tr1, tr2-GSR-Tgd-Rd.

Para delimitar esta región enhancer se partió de un fragmento de unas 6 kb. En primer lugar se ensayaron 3 subfragmentos en construcciones con el promotor homólogo de *sc* (Fig. 8A). Solamente el HC3.5ANP reprodujo el mismo patrón de expresión de *lacZ* que el fragmento original (Fig. 8B). Seguidamente, ensayamos varias deleciones terminales del fragmento HC3.5ANP en construcciones con el promotor heterólogo *hsp70*. Encontramos una progresiva desaparición de la expresión de *lacZ* en algunos de los grupos proneurales (Fig. 8C-E y tabla de la Fig. 8A). Ello indicó que

Figura 8. Delimitación del enhancer para los grupos proneurales ANP, APA-tr1-tr2, Tgd, Rd y GSR. **A.** Esquema del fragmento de 6 kb descrito en Gómez-Skarmeta y cols. (1995), y de los subfragmentos ensayados para delimitar la actividad enhancer. Solamente los fragmentos de color verde o morado oscuro dirigieron la expresión de *lacZ* en los discos imaginales. La tabla muestra el número de líneas transformantes ANP-X con expresión en cada uno de los grupos proneurales/total de líneas ANP-X ensayadas. **B-E** Expresión dirigida por los fragmentos indicados en los discos imaginales, revelada por tinción histoquímica con X-Gal. Sólo se muestran discos representativos para cada construcción.



el fragmento HC3.5ANP contiene secuencias independientes necesarias para la expresión en los distintos grupos proneurales. Las secuencias específicas para la expresión en el grupo proneural APA-tr1-tr2 se encontrarían en los 563 pb situados entre las construcciones HC3.5ANP y ANP-A; las del grupo Rd en el fragmento de 446 pb entre las construcciones ANP-A y ANP-B; las responsables de los grupos ANP y Tgd en el fragmento de 634 pb entre ANP-B y ANP-C; y las requeridas para la expresión en la GSR se encontrarían en el fragmento de 357 pb entre las construcciones ANP-E y ANP-F. En esta última ronda de construcciones con el promotor *hsp70* observamos que la expresión del marcador en los grupos proneurales correspondientes se encontraba disminuida con respecto a la del fragmento original ensayado con el promotor de *sc* (Fig. 8B-E). Como comentaremos posteriormente, creemos que este efecto se debe a la menor fortaleza del promotor *hsp70* con respecto al promotor del gen *sc*.

Secuencia de los enhancers para los grupos proneurales ANP, APA-tr1-tr2, GSR, Tgd y Rd.

Secuenciamos el fragmento HC3.5ANP para obtener algún dato sobre la identidad de los factores que pudieran interaccionar con los enhancers. Encontramos varios motivos consenso como cajas A, motivos de unión para proteínas con dominios de “cremallera de leucinas”, cajas TAAT de unión de homeoproteínas, cajas GATA de unión de proteínas con dedos de Zinc, y una caja E y otra N, secuencias reconocidas por proteínas bHLH proneurales y neurogénicas respectivamente (Fig. 9). La posible funcionalidad de estas secuencias, así como la identificación de los factores que se pudieran unir a ellas no se ha determinado.

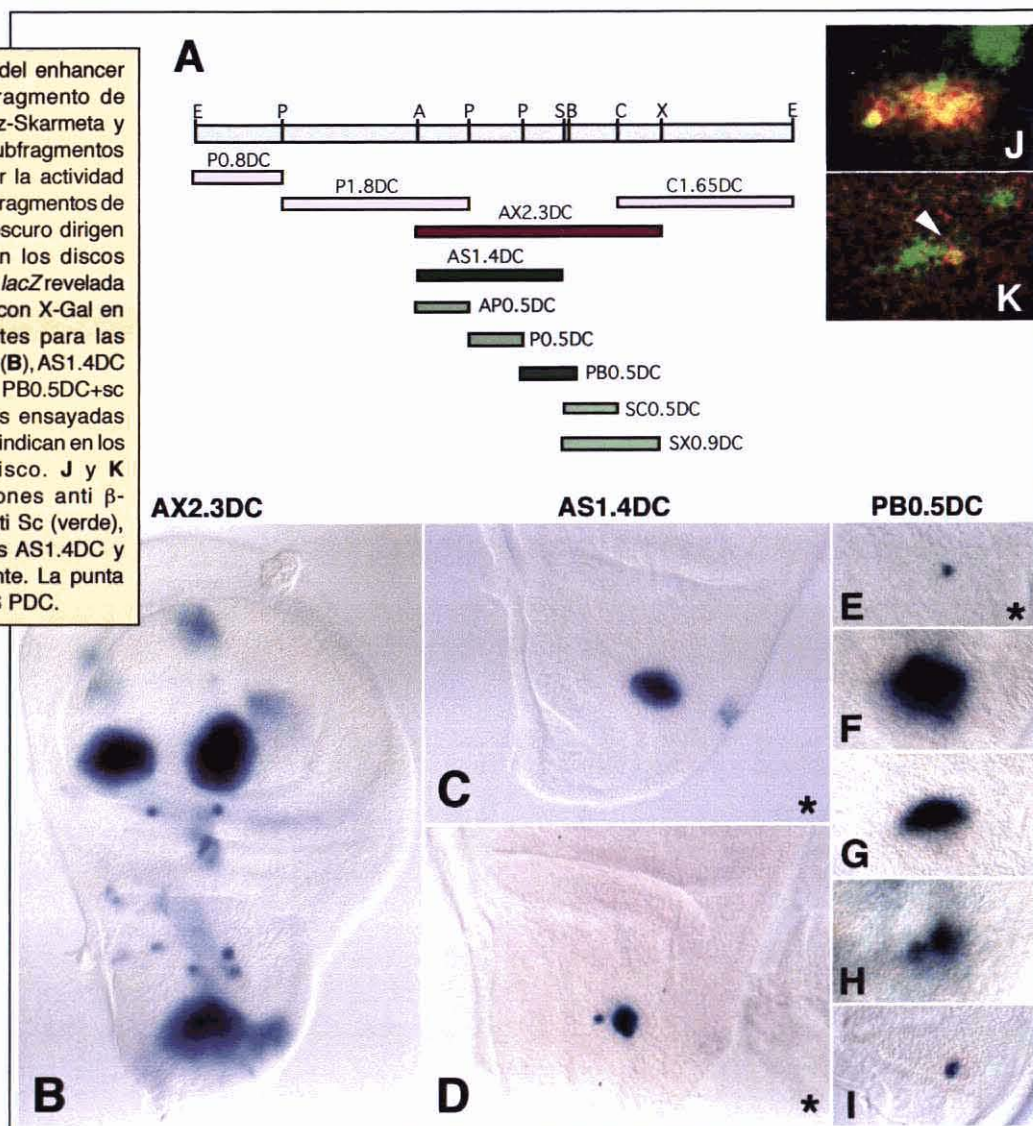


Figura 9. Secuencia de la región con actividad enhancer en los grupos proneurales ANP, APA-tr1-tr2, Rd, Tgd y GSR. Las flechas indican el extremo 5' de los fragmentos HC3.5ANP, ANP-A, ANP-B, ANP-C, ANP-E y ANP-F descritos en la Fig. 8. Se han resaltado varios motivos de unión para factores de transcripción como cajas TAAT (subrayado), cajas A (sombreado amarillo), cajas N (sombreado malva) y cajas E (sombreado rosa).

Delimitación del enhancer dorsocentral.

También procedimos a delimitar el enhancer DC en dos rondas de construcciones. En la primera, ensayamos cuatro fragmentos parcialmente solapantes del fragmento original de 5.7 kb (Fig. 10A) utilizando el promotor de *sc*. Solamente uno de ellos, el AX2.3DC, reprodujo la expresión del gen marcador en el grupo DC, con la misma intensidad y localización que el fragmento de 5.7 kb (Fig. 10B). Los otros fragmentos carecían de actividad. Seguidamente analizamos subfragmentos de AX2.3DC, en construcciones con el promotor *hsp70*. Dos subfragmentos dirigieron expresión de *lacZ* en el grupo DC: AS1.4DC, lo hacía en el área precisa en la que se expresan los genes proneurales *ac* y *sc* (Fig. 10J), aunque con intensidad menor que la obtenida con el fragmento AX2.3DC (Fig. 10B-D). PB0.5DC, un subfragmento de AS1.4DC, también dirigía expresión en el área DC, aunque débilmente y limitada a una célula que coincide con la CMOS para la queta posterior dorsocentral (PDC) (Fig. 10E y K).

Figura 10. Delimitación del enhancer DC. **A.** Esquema del fragmento de 5.7kb descrito en Gómez-Skarmeta y cols. (1995), y de los subfragmentos ensayados para delimitar la actividad enhancer. Solamente los fragmentos de color verde o morado oscuro dirigen la expresión de *lacZ* en los discos imaginales. **B-I** Expresión *lacZ* revelada por tinción histoquímica con X-Gal en los discos transformantes para las construcciones: AX2.3DC (**B**), AS1.4DC (**C** y **D**), PB0.5DC (**E**) y PB0.5DC+*sc* (**F-I**). Las construcciones ensayadas con el promotor *hsp70* se indican en los paneles por un asterisco. **J** y **K** muestran doubles tinciones anti β -galactosidasa (rojo) y anti Sc (verde), en discos transformantes AS1.4DC y PB0.5DC, respectivamente. La punta de flecha indica la CMOS PDC.



El fragmento PB0.5DC también se ensayó colocándolo 5' de un fragmento de aprox. 1 kb que contenía el promotor de *sc* y los enhancers de los grupos proneurales L3 y TSM, todo ello dirigiendo la expresión de *lacZ*. En este caso, se observaron grandes diferencias entre las líneas transformantes obtenidas. En algunas, la expresión se limitaba a la CMOS para la queta PDC, mientras que en otras abarcaba todo el grupo proneural (Fig. 10F-I).

Así pues, concluimos que probablemente toda la información espacial necesaria para la expresión de *ac* y *sc* en el grupo DC está contenida en el fragmento PB0.5DC, pero que se necesitan secuencias adicionales para potenciar los niveles de expresión. Suponemos que estas secuencias deben estar presentes, al menos en parte, en el fragmento AS1.4DC y por lo tanto hemos utilizado este fragmento como el enhancer mínimo para el grupo DC. En lo sucesivo nos referiremos a la expresión dirigida por AS1.4DC como actividad del enhancer DC, o como actividad/expresión DC-*lacZ*.

El enhancer DC dirige niveles de expresión heterogéneos en las células del grupo proneural DC.

Al analizar la expresión DC-*lacZ* usando anticuerpos contra la β -galactosidasa, se observa que no todas las células del grupo proneural se tiñen por igual: parece haber una expresión mayor en las células del grupo proneural que se diferenciarán como CMOS (Fig. 13A panel +/+). Esta mayor expresión podría explicar por qué el subfragmento PB0.5DC, que carece de algunas de las secuencias que potencian la actividad enhancer, dirige la expresión exclusivamente en la CMOS para la queta PDC. Sin embargo, también hemos observado situaciones intermedias, como el caso de una de las líneas transformantes para la construcción AS1.4DC, que muestra expresión en un grupo de células de la región próxima a la CMOS PDC y en el precursor para la queta anterior-dorsocentral (ADC) (Fig. 10D).

En principio, la expresión dirigida por los enhancers de grupo proneural no depende de las proteínas proneurales, ya que no se altera en ausencia de dichas proteínas (fondo genético *sc*^{10.1}; Gómez-Skarmeta y cols., 1995). Este también es el caso para la expresión

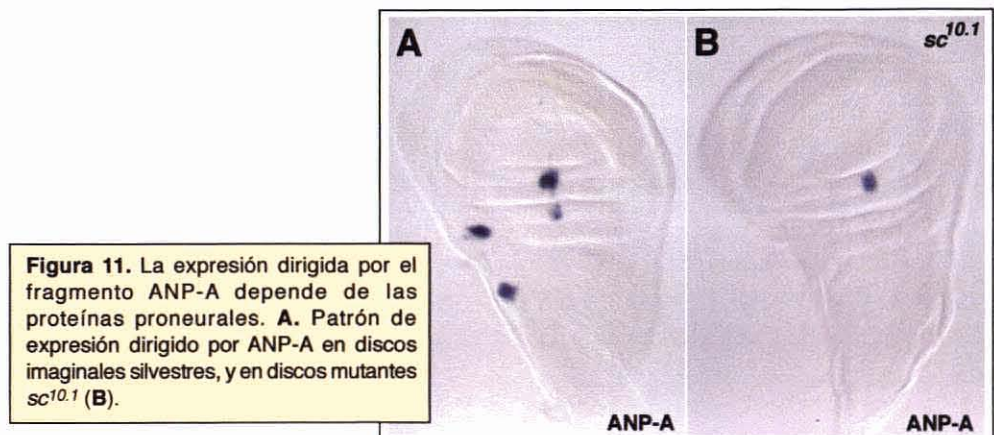


Figura 11. La expresión dirigida por el fragmento ANP-A depende de las proteínas proneurales. **A.** Patrón de expresión dirigido por ANP-A en discos imaginales silvestres, y en discos mutantes *sc*^{10.1} (**B**).

dirigida por la construcción AS1.4DC (no mostrado). Sin embargo, la expresión dirigida por PB0.5DC en la CMOS para la PDC desaparece en discos *sc^{10.1}* (no mostrado). Lo mismo sucede para la construcción ANPA, que pierde la expresión en algunos grupos proneurales en mutantes *sc^{10.1}* (Fig. 11). Así pues, parece que las proteínas proneurales pueden influir en el funcionamiento de algunos enhancers.

```

1  GAGGAACAAA GAGCAGTCAG CATTTATATA CTTTGTGATT ACGGACGGAC
51  AGTCCCAAAA AGCATTCTGT GCGAAGCACT TAACGCCAAA AGTGAACAAA
101 ACAACAC TTG CTCTATTAAC ACGCCACACT GTCTGAAGGC AGTCGGCTTA
151 ACGAGAAACA AGAATATCC T ACGTGTGGCT AATTTGCGGT TAAGGAAGGC
201 CCCATGATAT ATAAAGCCAA AAAATAAAGC AAAACCGCAG CAGTTCATT C
251 AAATTTT TTG TGGCCAAAAC AAATATTAAG ATAAAGTCA GTGGGACTA
301 TAATTTGAGT TATTCAAATG CAATAAATCC GCGGAACCAA ACGAGTTGCT
351 AATTTTACGT TAGACGCCCT TTAATTTTAC GCTGCCATTT GTGGCTTCCG
401 TTTTCGTATA GTTTGGGTCG ATGATTTTGA GAATTTGCAT TTTCAATTTG
451 AATATAAAAA ACCGCCGCTG CAGGT TTGCA GCTTTTAAAG TGATCCGCAA
501 TCTCATTCTT AGTCAGTCGA AAAAAGGTAA GATAGAGAAA AGAACAGAAA
551 TGA CTACAAA ATTAAGTACC GAATTTGTG CCATCGTAAT AGTTTTTCGC
601 CATTTCCCTT TCACGGGTTT AACTGTTAAT TATGTAA TTA AATGTAAAGT
651 CGTGGAATC GCGT TTTT T CTTGATCAAT ATACACATAT TTCCGGCGCA
701 AATGCTATTT TTATGAGCAT TTCATGTAAT TATTGAGACT AATAGGAAGA
751 CAGATCTTGT TTGGGTGCAG GGAAAGTTCA ACTTAATCGC TCAATTTGAG
801 ATCGCCTGGT CCTTGAGAT TCGACTGTAA TTGAAATTT TGCTTTTGAT
851 CGGAGCCAGA CTT CAGACGG GGCAAACAAA AAGACTT TGT TGGTGGTAGG
901 GTAGGATCGT AAAAAGAACT CAGAACAGAA CCAGAATAAA AATTCGATA
951 AGGATTGTGA GCCTGTAGTC GTACAAAAAA AGATAATCT GTCTGCAGGT
1001 ACAAAAAAAA GGCAGATATA GTTGGCAGCT GTATAAACT AATGCACTTG
1051 CAGTCCAATC TAATCGTTTG CCAAATGTCA AACGAGTTT ATTCATCCGG
1101 CGATACCCTT TCCTTTAAAT CTTCTTTT CTTTTT TTA AAGTAACTG
1151 TGAGTCAGCT CATTCATGGA GAACCGTGAC GATAAGTCCG CCTCTTTATT
1201 TTCGATATGA CAAACACGCG TGAATAGCGT CAAACGTTT TAGAGCTTT
1251 ATCTCATGG TTAAATTAAA AGGTTATTCT TGTAGGCAGG ATAACATTGC
1301 GGCCGAAAGG ATGCAATTGA ATTGTCTGTA TTGGGGTAAT TATTCAGTGC
1351 CTTATCTTAA AGACTTTCTG ACCTTCCCAT CCAACGAAA AACCGAAAGT
1401 CGAC

```

Figura 12. Secuencia del enhancer DC. Las zonas sombreadas en verde indican áreas de conservación con la secuencia homóloga de *D. virilis* (ver anexo I). Los nucleótidos enmarcados corresponden a sitios consenso GATA, los subrayados a cajas TAAT y los sombreados a sitios consenso E (rosa) y N (morado). El número de acceso GenBank/EMBL para esta secuencia es AF132808.

El enhancer DC contiene motivos de unión para factores de transcripción.

El fragmento AS1.4DC se secuenció y se buscaron en su secuencia posibles sitios de unión para factores de transcripción (Fig. 12). La secuencia contiene varias cajas que cumplen el consenso para la unión de factores de la familia GATA-1 y más concretamente para la proteína Pnr (cajas de la Fig. 12). Estos factores de transcripción reconocen con sus dominios de tipo dedos de Zinc secuencias A/TGATAA/G y GATAAG, respectivamente (Evans y cols., 1988; Haenlin y cols., 1997). La función de Pnr como regulador del enhancer DC y la funcionalidad de estas cajas consenso se tratará posteriormente. En la secuencia también se encuentran cajas TAAT, de unión de homeoproteínas, y motivos E y N de unión de proteínas tipo bHLH. La posible función de estas últimas cajas se desconoce (ver Discusión). Sin embargo, el motivo TAAT subrayado en la Fig.12 es importante para el funcionamiento del enhancer, ya que la mutagénesis del mismo anula completamente la actividad DC-*lacZ* (datos no mostrados).

Conservación evolutiva de la secuencia del enhancer DC.

Está aceptado que las secuencias no codificantes conservadas entre especies suficientemente distantes desde el punto de vista evolutivo, probablemente corresponden a regiones con un importante papel regulador o estructural. En cambio, otras regiones de ADN meramente espaciadoras o sin función importante pueden divergir ampliamente al verse libres de una presión selectiva. Estos criterios de funcionalidad para la homología entre secuencias de diferentes especies son la base de los estudios comparativos de elementos enhancer. *D. melanogaster* y *D. virilis*, dos especies que se separaron filogenéticamente hace unos 60 millones de años (Beverly y Wilson, 1984), se utilizan frecuentemente para análisis de este tipo. Así pues, emprendimos la secuenciación de la región de ADN correspondiente al enhancer DC en *D. virilis*. Previamente D. Beamonte en nuestro laboratorio clonó el CAS de *D. virilis* (Beamonte, 1990) y encontró que la organización general de dicho complejo es la misma en ambas especies. Así, los genes *ac*, *sc*, *l'sc* y *ase* se encuentran en posiciones análogas y separados por ADN no transcrito de longitud equivalente, aunque 1.8 veces mayor en *D. virilis* que en *D. melanogaster*. Por lo tanto, era probable que el enhancer DC se encontrara en *D. virilis* en la región 5' del gen *ac*, tal como ocurre en *D. melanogaster*. Para identificar las regiones homólogas, realizamos hibridaciones a baja estrictencia con fragmentos del fago λ MS107, que contiene el gen *ac* de *D. virilis*, así como 16 kb de ADN genómico en dirección 5' del mismo. Utilizamos como sondas el fragmento AS1.4DC y subfragmentos de este (AP0.5DC, P0.5DC, PB0.5DC). Dos fragmentos de λ MS107 hibridaron con dichas sondas (no mostrado). Secuenciamos estos fragmentos, así como la región comprendida entre ellos. La comparación de la secuencia obtenida (un total de 6.1 kb, ver anexo I) con la secuencia de AS1.4DC reveló la presencia de zonas conservadas que aparecen señaladas en la Fig. 12 con un sombreado verde.

Los datos de conservación interespecífica permiten dividir el enhancer DC en tres zonas (puntas de flecha en Fig. 12). Las zonas correspondientes a los fragmentos AP0.5DC y PB0.5DC tienen grandes áreas conservadas, mientras que la zona intermedia, correspondiente a P0.5DC, solamente posee unos pocos pares de bases conservados. Algunos de los sitios consenso para la unión de factores de transcripción que se encuentran en el enhancer DC están conservados interespecíficamente, un posible indicio de su importancia funcional.

Identificación de factores de prepatrón para el enhancer DC.

Con el fin de identificar factores desconocidos que pudieran unirse al enhancer DC, realizamos un rastreo en genotecas de expresión para *Drosophila*. Dicha técnica se ha utilizado ampliamente para buscar factores que interaccionen con secuencias definidas de unos pocos pares de bases (Singh y cols., 1988). Sin embargo, nosotros utilizamos como sonda el fragmento PB0.5DC, al no poder delimitar más finamente la importancia funcional de las secuencias del fragmento AS1.4DC. Identificamos un único clon con unión específica al fragmento PB0.5DC que resultó contener secuencias correspondientes a la isoforma p69 del gen *tramtrack* (*ttk*) (Harrison y Travers, 1990). Esta isoforma codifica un factor con dos dominios dedos de Zinc que reconocen específicamente las secuencias TTATCCG identificadas en el elemento enhancer “cebra” del gen *fushi tarazu*, unión que determina la represión de dicho gen en estadios embrionarios (Harrison y Travers, 1990; Read y Manley, 1992; Brown y Wu, 1993). En discos imaginales de la tercera fase larvaria, la proteína Ttk p69 se expresa de manera generalizada, a excepción de unas pocas células que, por su localización, parecen corresponder a los grupos proneurales (no mostrado). Posteriormente, en estadios pupales, se ha descrito que Ttk p69 se expresa en una de los dos células hijas de las CMOS, expresión que se ha relacionado con una función en la determinación de dicha célula como órgano sensorial externo (Guo y cols., 1996; Ramaekers y cols., 1997).

El fragmento PB0.5DC contiene un sitio consenso para unión de la proteína Ttk p69 (posición 1287 en la Fig. 12). Sin embargo, dicho sitio de unión no está conservado interespecíficamente y por lo tanto, la unión de Ttk a PB0.5DC en el experimento de rastreo podría no corresponderse con una interacción funcional *in vivo*. El patrón de expresión de Ttk p69 en discos imaginales tampoco sugiere una posible función de *ttk* como gen de prepatrón específico para la región DC del disco imaginal. Así pues, decidimos no continuar investigando la posible relación funcional *in vivo* entre *ttk* y el enhancer DC, por alejarse de nuestros objetivos iniciales.

PARTE II

REGULACION DEL ENHANCER DC POR EL PREPATRON DEL DISCO IMAGINAL. CONTRIBUCION RELATIVA DE *pnr* Y *wg*.

Antes de comenzar el trabajo de esta tesis, Pannier y Wg habían sido involucrados en el control de la expresión de *ac-sc* en el grupo proneural DC y se había supuesto que eran componentes del prepatrón que especifica esta región del disco imaginal (Phillips y Whittle, 1993; Romain y cols., 1993). La presencia en el enhancer DC de sitios consenso de unión para factores de la familia GATA-1, nos impulsó a estudiar la posible función de Pnr como regulador directo del enhancer DC. Asimismo, nos planteamos como objetivo investigar cuál era la contribución relativa de los genes *pnr* y *wg* a la expresión mediada por el enhancer DC.

Pnr es un activador transcripcional en la región DC.

En 1993, se propuso que Pnr era un regulador de *ac* y *sc* en la región DC (Fig. 4; Romain y cols., 1993). Sin embargo, se ignoraba si este factor de transcripción actuaba directa o indirectamente sobre la transcripción de estos genes. Asimismo, debido a la dificultad de interpretar los datos moleculares de las mutaciones *pnr*, se ignoraba si su función era activadora o represora en la regulación del grupo proneural DC.

Con el fin de averiguar si Pannier tiene un efecto activador o represor sobre la expresión DC-*lacZ*, analizamos la expresión de este transgén en distintas combinaciones mutantes para *pnr* (Fig. 13). Una condición heterocigota para el alelo amorfo *pnr^{VX6}* produce una drástica disminución de la expresión dirigida por el enhancer DC (Fig. 13 panel VX6/+). La expresión desaparece completamente y de manera autónoma, en clones de recombinación mitótica homocigotos para *pnr^{VX6}* (Fig. 13B). Así pues, *pnr* es un activador de la expresión dirigida por el enhancer DC. Combinaciones hipomorfas *pnr* también afectan severamente la actividad DC-*lacZ*

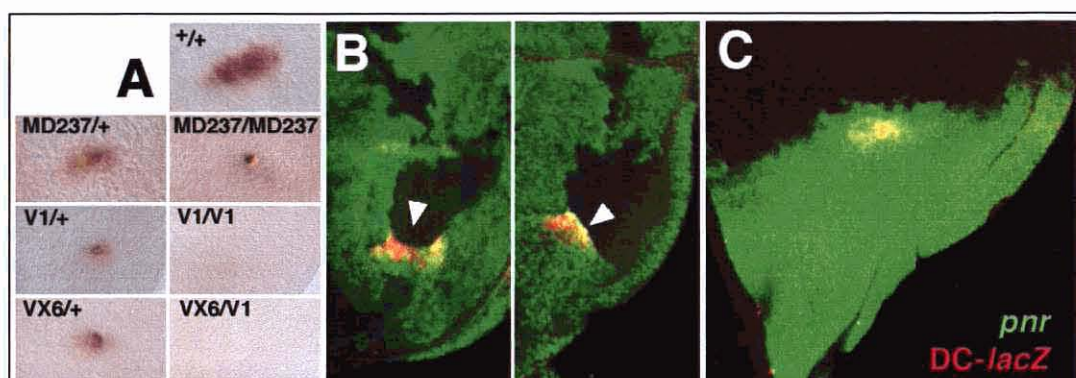


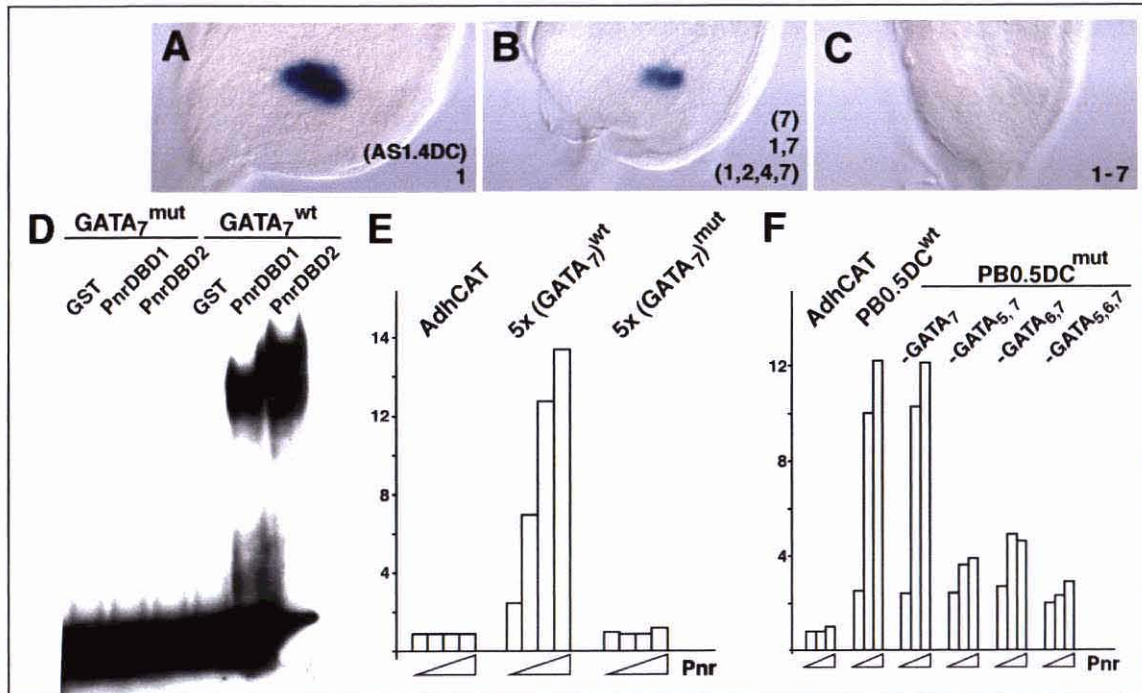
Figura 13. La expresión DC-*lacZ* se modifica en mutantes hipomorfos para *pnr*. **A.** Los paneles muestran la expresión DC-*lacZ* (revelada mediante tinción con anticuerpo anti β -galactosidasa) en discos imaginales de las combinaciones alélicas *pnr* que se indican en cada caso ("+" simboliza una copia silvestre del gen). Solamente se muestra una ampliación de la región DC. **B.** Discos imaginales en los que se han inducido clones del alelo nulo *pnr^{VX6}*. La expresión DC-*lacZ* (canal rojo) desaparece de manera autónoma en los clones (puntas de flecha), marcados por ausencia del marcador myc (en verde). **C.** El grupo proneural DC, definido por la expresión DC-*lacZ* está incluido dentro del dominio de expresión de *pnr* (revelado por la expresión de UAS-GFP en discos *pnr^{MD237/+}*).

(Fig. 13A) La intensidad de la expresión en estas combinaciones nos ha permitido ordenar los alelos hipomorfos de *pnr* en función del grado de pérdida de función. Así, de los dos alelos hipomorfos, *pnr*^{MD237} parece tener más producto funcional que *pnr*^{V1} con respecto a su capacidad para activar la expresión de DC-*lacZ*.

De acuerdo con la función activadora de *pnr* sobre el enhancer DC y con su requerimiento autónomo, el grupo DC se localiza dentro del dominio de expresión de *pnr*, tal como indica la expresión dirigida por el enhancer DC en discos imaginales en los que el dominio de expresión de *pnr* se ha revelado mediante el transgén *UAS-GFP* dirigido por la línea *GAL4 pnr*^{MD237} (Fig. 13C).

Pnr interacciona directamente con el enhancer DC.

En el enhancer DC se encuentran 7 posibles sitios de unión para la proteína Pnr. Tres de ellos (cajas numeradas como 1, 2 y 4 en la Fig. 12) se ajustan al consenso A/TGATAA/G de unión para factores de la familia GATA-1 (Evans y cols., 1988). Otros tres (cajas 3, 5 y 6) cumplen el consenso GATAAG deducido para la proteína Pnr (Haenlin y cols., 1997). Y uno de ellos (caja 7) cumple ambos tipos de consenso. Determinamos la función de estas cajas mediante experimentos de mutagénesis



dirigida. Así, ensayamos la capacidad de AS1.4DC para dirigir la expresión de *lacZ* en el grupo DC cuando se alteran uno o varios de los posibles sitios de unión de Pnr (Fig. 14A-C).

Diseñamos varias construcciones con diferentes combinaciones de cajas GATA mutadas, teniendo en consideración la posible funcionalidad de cada una de estas cajas. Para ello evaluamos tres criterios: la posición de las cajas GATA en el enhancer DC, la homología con los dos consensos de unión, y su ubicación en un área de conservación interespecífica. Encontramos que la mutagénesis de algunas de las cajas o de combinaciones de ellas, disminuye la intensidad de expresión (Fig. 14B), mientras que la mutagénesis simultánea de todas las cajas la suprime por completo (Fig. 14C). Estos resultados sugieren que Pnr actúa directamente uniéndose a las cajas GATA del enhancer DC. Además nuestros datos indican que para una óptima actividad transcripcional, es necesario un cierto número de sitios de unión para Pnr en el enhancer.

La interacción de la proteína Pnr con las cajas GATA del enhancer DC se confirmó gracias a la colaboración de Philippe Romain, quien realizó dos tipos diferentes de ensayos. Por un lado, Romain realizó ensayos de retardo en gel con oligonucleótidos correspondientes a dos de las cajas GATA del enhancer DC (GATA 1 y 7) más sus secuencias flanqueantes, así como con versiones de estos oligonucleótidos con las cajas GATA mutadas. En estos ensayos, la proteína Pnr reconoció ambas cajas GATA, pero no se unió a las versiones mutadas de las mismas (Fig. 14D y no mostrado).

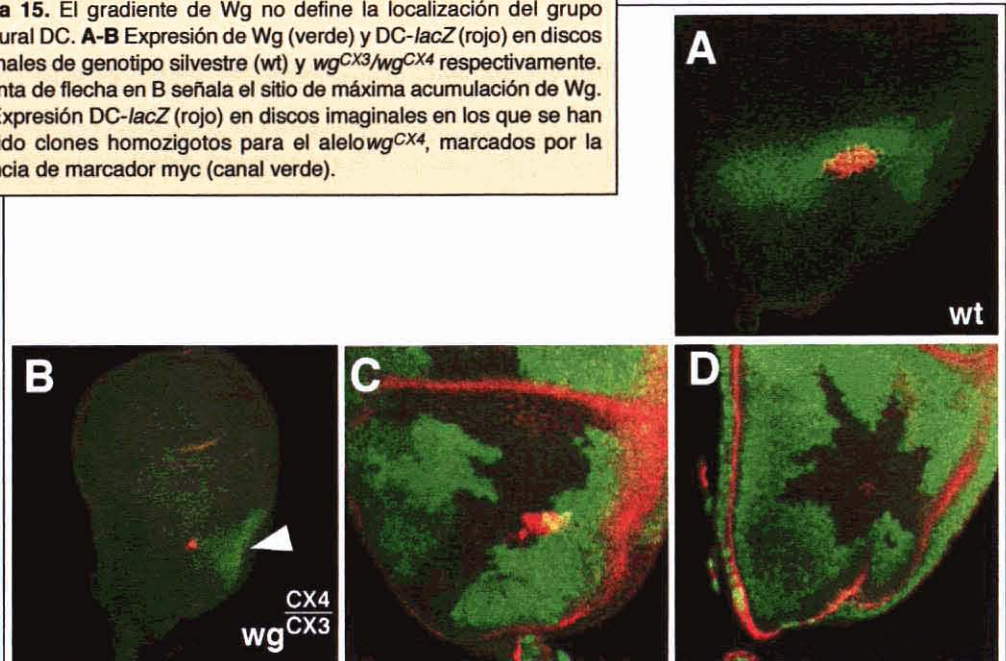
En el otro tipo de ensayos, se usaron células embrionarias de pollo para analizar la capacidad transcripcional activadora de Pnr mediada por las cajas GATA del enhancer DC. Para ello, se midieron los niveles de actividad CAT (cloranfenicol acetil transferasa) en células que expresaban Pnr y que portaban construcciones para la expresión del gen marcador CAT bajo el control de los oligonucleótidos GATA1 y GATA7 utilizados en el experimento de retardo (Fig. 14E y no mostrado), o de los fragmentos AP0.5DC, P0.5DC y PB0.5DC del enhancer DC (Fig. 14F). En los experimentos con oligonucleótidos, solamente la versión silvestre del oligonucleótido GATA7 mostró actividad (Fig. 14E y no mostrado). En los experimentos con subfragmentos del enhancer DC, solamente PB0.5DC pudo mediar la expresión del gen marcador (Fig. 14F). También se ensayaron, mediante esta técnica, la actividad de las versiones mutadas del fragmento PB0.5DC que nosotros utilizamos en los experimentos de mutagénesis en *Drosophila*. Los resultados mostraron que la mutagénesis de una o dos de las cajas GATA de este fragmento disminuye la activación mediada por el mismo y que la mutagénesis simultánea de todas las cajas presentes (GATA 5, 6 y 7), suprime dicha activación (Fig. 14F). Este último resultado corroboró nuestra observación de que son necesarias varias cajas GATA para un correcto funcionamiento del enhancer DC.

La proteína Wg es necesaria para la actividad del enhancer DC.

En el territorio de notum de discos imaginales de tercer estadio larvario, *wg* se expresa en una banda de células perpendicular al eje antero posterior. La proteína Wg se segrega al espacio intercelular y parece que puede difundir hasta 25 diámetros celulares (Cadigan y cols., 1998), aunque mediante técnicas inmunocitoquímicas solamente se detecta a muy poca distancia de las células que la sintetizan. Para definir la posición del grupo proneural DC con respecto al gradiente de concentración de Wg en discos de tercer estadio larvario, realizamos dobles tinciones para visualizar la expresión DC-*lacZ* y la de Wg. La expresión DC-*lacZ* se encuentra fuera del centro de la banda de acumulación de Wg pero, como puede apreciarse en la Fig. 15, Wg se detecta en una parte de las células del grupo proneural DC. Considerando la baja sensibilidad de la tinción con anticuerpo y la proximidad al centro de la banda de Wg, está claro que todas las células que forman parte de este grupo proneural reciben Wg, pero en diferentes cantidades.

La expresión DC-*lacZ* en combinaciones mutantes *wg* hipomorfas, muestra un requerimiento de la función *wg*. Así, el alelo nulo *wg^{CX4}* en heterocigosis solo permite una expresión reducida. Esta se reduce aún más en la combinación alélica hipomorfa *wg^{CX4}/wg^{CX3}* (Fig. 15B). No obstante, hay que destacar que estas reducciones no modifican la localización de la expresión, que sigue en la región DC, a pesar del cambio de orientación del gradiente de Wg (punta de flecha en la Fig. 15B) y de la nueva concentración de Wg en la zona (Fig. 15B). Estos resultados se verificaron mediante el análisis de clones de recombinación mitótica homocigóticos para el alelo nulo *wg^{CX4}*. Los clones, a pesar de modificar escalar y vectorialmente el gradiente de Wg, no afectan la localización de la expresión DC-*lacZ*. Solo disminuyen su intensidad, de

Figura 15. El gradiente de Wg no define la localización del grupo proneural DC. **A-B** Expresión de Wg (verde) y DC-*lacZ* (rojo) en discos imaginales de genotipo silvestre (wt) y *wg^{CX3}/wg^{CX4}* respectivamente. La punta de flecha en B señala el sitio de máxima acumulación de Wg. **C-D** Expresión DC-*lacZ* (rojo) en discos imaginales en los que se han inducido clones homocigotos para el alelo *wg^{CX4}*, marcados por la ausencia de marcador myc (canal verde).

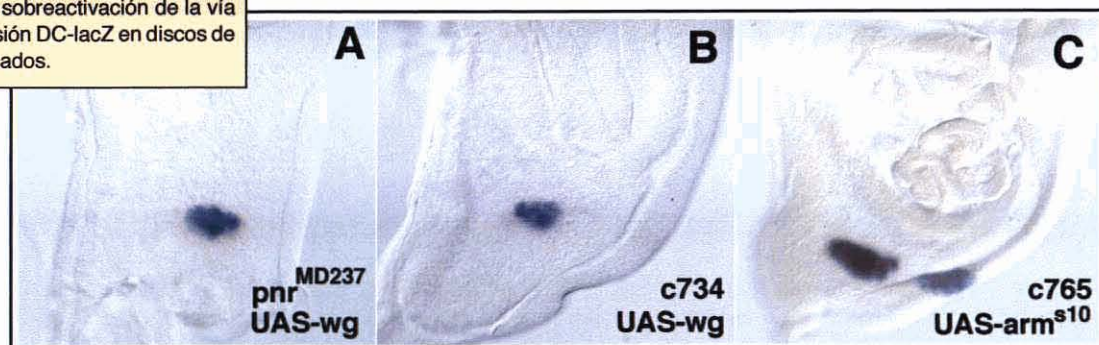


manera más drástica cuanto más grande es el clon mutante (comparar Fig. 15C con Fig. 15D). Estos resultados indican que la posición del grupo proneural DC no está determinada por el gradiente de Wg.

La expresión espacialmente restringida de la proteína Wg no determina la localización del grupo proneural DC.

La relación espacial entre la banda de *wg* y el grupo DC, y el requerimiento de Wg para la expresión en este grupo proneural (Phillips y Whittle, 1993), han propiciado que *wg* sea considerado como uno de los genes que determinan la posición del grupo proneural DC a lo largo del eje dorso-lateral (Phillips y Whittle, 1993; Tomoyasu y cols., 1998). De ser así, la expresión DC-*lacZ* debería cambiar de posición al modificar el gradiente de Wg. Como ya hemos visto, nuestros resultados con condiciones *wg* hipomorfas no apoyan esta proposición. Tampoco se modifica la posición de la expresión DC-*lacZ* al expresar ectópicamente *wg* en discos imaginales mediante la técnica GAL4/UAS. Así, en discos imaginales en los que *wg* se sobreexpresó en el dominio de expresión de *pnr* (línea *pnr*-GAL4) o en una región similar a la definida por la expresión del gen *dpp* (línea *c734*), no se alteró la expresión de DC-*lacZ* (Fig. 16A y B). Tampoco se observó ninguna alteración al sobreexpresar *wg* en el mismo grupo proneural DC (línea *c253*, no mostrado). Idénticos resultados se obtuvieron al sobreexpresar factores que participan en la vía de transducción de Wg, como una forma alterada de la proteína Arm (*UAS-arm^{s10}*; van de Wetering y cols., 1997) con actividad constitutiva (Fig. 16C).

Figura 16. La expresión DC-*lacZ* no se altera en condiciones de sobreactivación de la vía de Wg. **A-C** Expresión DC-*lacZ* en discos de los genotipos indicados.



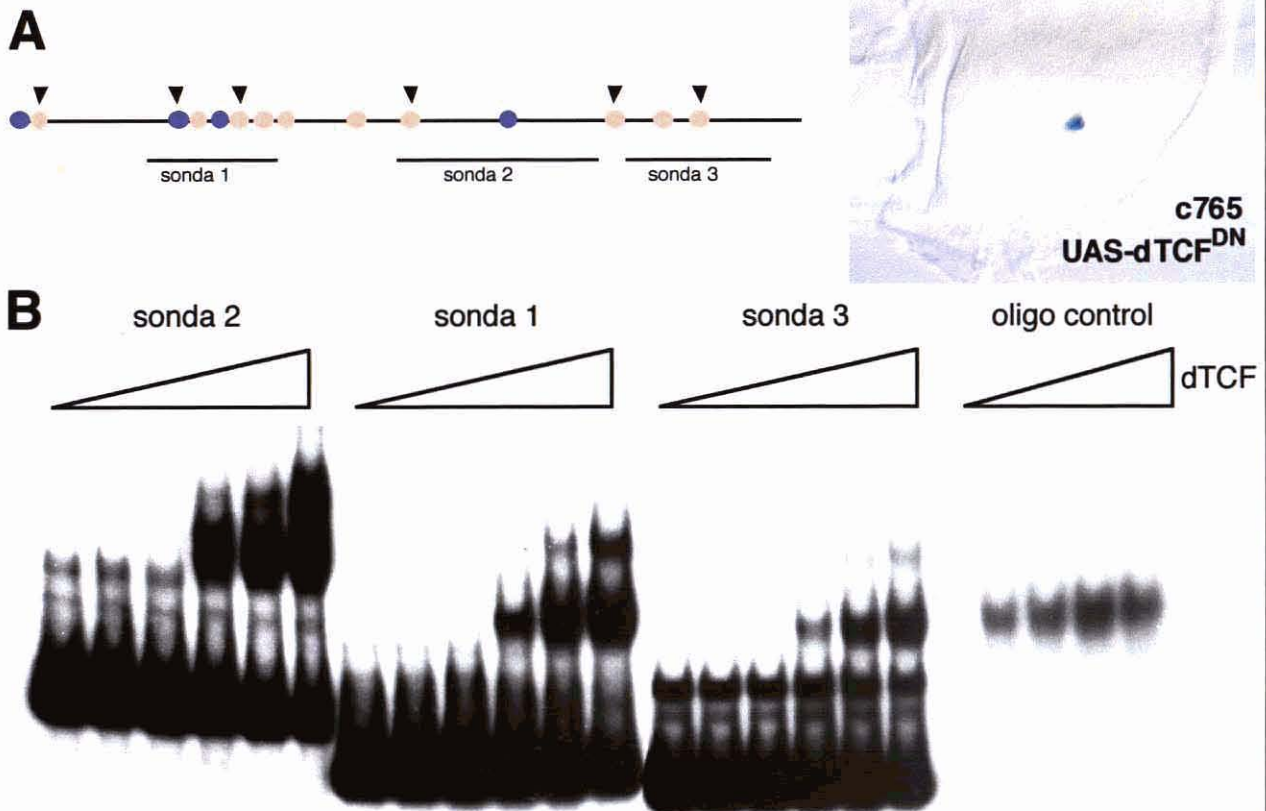
Así pues, nuestros resultados muestran que si bien Wg es necesario para una correcta activación del enhancer DC, el gradiente de esta proteína no determina la posición del grupo proneural DC en el disco imaginal de ala.

Los componentes intracelulares de la vía de transducción de Wg probablemente actúan sobre el enhancer DC.

Los últimos componentes de la vía de transducción de Wg conocidos son las proteínas Arm y dTCF. La unión de dicho complejo al ADN está mediado por dTCF, una proteína con un dominio HMG que reconoce las secuencias CCTTTGA/TA/T (van de Wetering y cols., 1997). Parece probable que el complejo Arm-dTCF participe en la activación del

enhancer DC, ya que éste contiene varios sitios muy parecidos a los consensos de unión descritos para estos complejos (Fig. 17A). Comprobamos la capacidad del dominio HMG de la proteína dTCF para reconocer secuencias en el enhancer mediante experimentos de retardo en gel. Pudimos observar la formación de complejos entre la forma de dTCF purificada a partir de extractos de *E. coli* y varios fragmentos del enhancer DC (Fig. 17B). Además, la sobreexpresión en discos imaginales de una forma dominante negativa del factor dTCF (*UAS-dTCF^{DN}*; van de Wetering y cols., 1997) produce una disminución de la expresión DC-*lacZ*, tal como sería esperable en una condición de falta de función de la vía de Wg (Fig. 17C). Así pues, es probable la presencia en el enhancer DC de sitios de unión funcionales para los complejos Arm-dTCF.

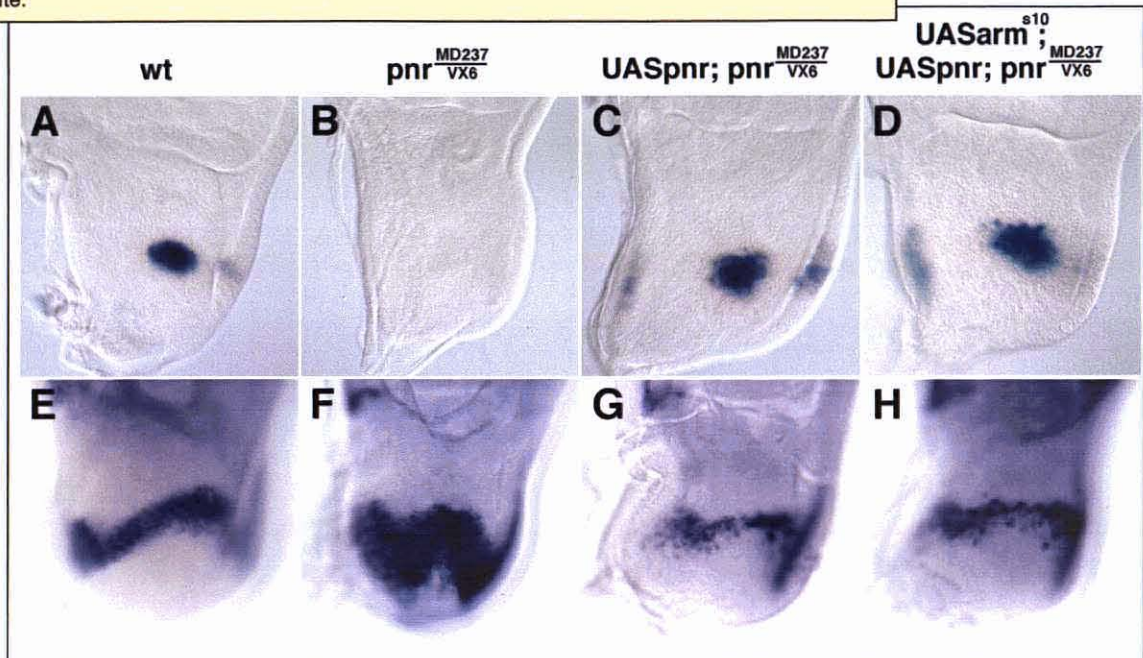
Figura 17. La proteína dTCF reconoce secuencias del enhancer DC. **A.** Esquema del fragmento AS1.4DC señalando la posición de las cajas consenso para la unión de dTCF. Los círculos azules y rosas indican respectivamente las cajas con uno o dos nucleótidos distintos a los de la secuencia consenso descrita por Wetering y cols. (1997). Las puntas de flecha indican que la caja se encuentra en una región conservada entre *D. melanogaster* y *D. virilis*. La posición de las cajas según la Fig. 12 es: 4, 21, 312, 335, 367, 396, 444, 483, 606, 717, 884, 1073, 1142 y 1228. **B.** Experimentos de retardo en gel con la proteína dTCF purificada a partir de extractos de *E. coli*. Las cantidades de proteína en el ensayo fueron de 0, 1, 10, 125, 250 y 500 ng. Como sondas se utilizaron los fragmentos de AS1.4DC que se señalan en A y como control, un oligonucleótido que contenía un sitio consenso para dTCF (ver Materiales y métodos). **C.** Expresión de DC-*lacZ* en un disco de genotipo c765 *UAS-dTCF^{DN}*.



Contribución relativa de Pnr y Wg a la expresión dirigida por el enhancer DC.

Tanto Pnr, mediante su unión a las cajas GATA, como Wg, indirectamente mediante la activación de proteínas subordinadas de su vía de transducción, participan en la activación de la expresión génica a través del enhancer DC. Ahora bien, teniendo en consideración que la expresión de *wg* está regulada por Pnr (Calleja y cols., 1996), cabe preguntarse cuál es la importancia relativa de estas dos proteínas para la expresión en el grupo proneural DC. Para ello, intentamos rescatar la ausencia de actividad DC-*lacZ* de los discos mutantes *pnr^{MD237}/pnr^{VX6}* mediante la sobreexpresión de los transgenes *UAS-pnr* y *UAS-arms^{s10}* (una forma mutante de *arm* que mimetiza una activación constitutiva de la vía de Wg). En los discos imaginales de genotipo *pnr^{MD237}/pnr^{VX6}* no hay expresión DC-*lacZ* debido a la condición hipomorfa para *pnr* (Fig. 18B), a pesar de que la expresión de *wg* está expandida dorsalmente respecto a discos silvestres (Fig. 18F). Así pues, la presencia de Wg incluso en mayores cantidades que en condiciones silvestres, no puede suplir la ausencia de Pnr para activar la expresión en el grupo proneural DC. La activación adicional de la vía de transducción de *wg* en estos discos, mediante la sobreexpresión de la línea *UAS-arms^{s10}* en el dominio de expresión de *pnr*, no rescata la expresión DC-*lacZ* (no mostrado). Sin embargo, la sobreexpresión de *pnr* (*UAS-pnr*) si restablece la expresión DC-*lacZ* en estos discos mutantes (Fig. 18C), a pesar de que en estas condiciones *wg* se expresa en un dominio más restringido que en los discos silvestres (Fig. 18G). Si además de sobreexpresar *UAS-pnr*, se sobreexpresa simultáneamente *UAS-arms^{s10}*, el resultado no se modifica (comparar Fig. 18C con Fig. 18D), del mismo modo que la sobreexpresión de *UAS-wg* o *UAS-arms^{s10}* no afecta la expresión DC-*lacZ* en discos silvestres (Fig. 16).

Figura 18. Contribución relativa de Pnr y de la vía de Wg a la actividad DC-*lacZ*. Expresión de DC-*lacZ* y de *wg* en discos imaginales de genotipos: silvestre (wt) (A, E), *pnr^{MD237}/pnr^{VX6}* (B, F), *UAS-pnr; pnr^{MD237}/pnr^{VX6}* (C, G), y *UAS-arms^{s10}; UAS-pnr; pnr^{MD237}/pnr^{VX6}* (D, H). En estas condiciones el alelo *pnr^{MD237}* actúa como línea activadora para la sobreexpresión de los transgenes UAS. La expresión de DC-*lacZ* (A-D) y de *wg* (E-H) se reveló por tinción histoquímica con X-Gal o por hibridación *in situ* con sonda marcada con digoxigenina, respectivamente.



A diferencia de *wg*, la sobreexpresión generalizada de *pnr* (línea c765) sí altera la expresión DC-*lacZ*, que se expande hacia la región lateral del disco imaginal (punta de flecha, Fig. 19A). También induce expresión ectópica aunque débil en el territorio precursor del ala adulta (asterisco, Fig. 19A). Así pues, el patrón de expresión restringido de *pnr* en la parte más dorsal del disco delimita lateralmente la posición del grupo proneural DC, mientras que *wg* solo desempeña un papel permisivo en la activación del enhancer DC.

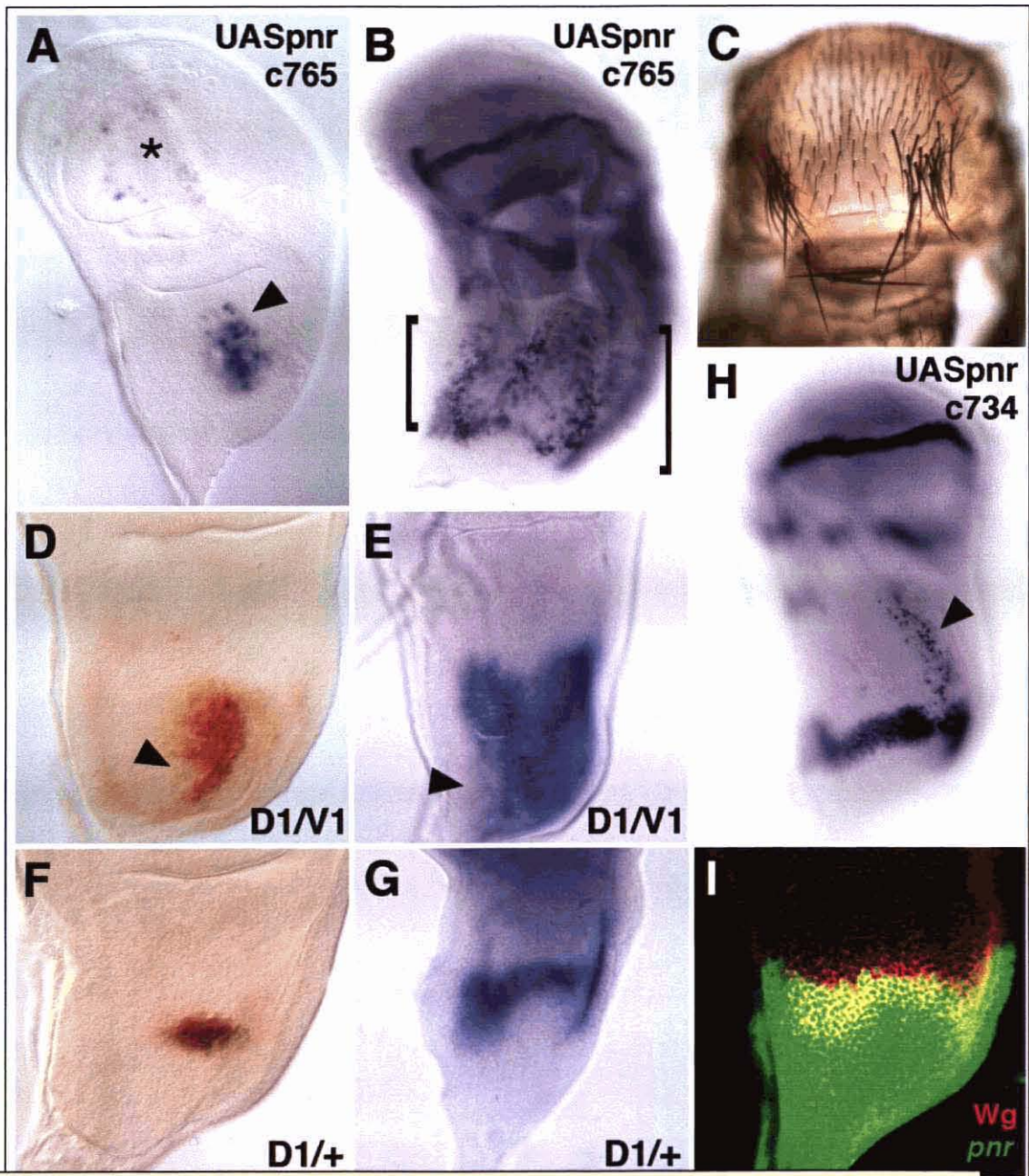


Figura 19. Efectos de la sobreexpresión de *pnr* sobre la expresión de DC-*lacZ* y de *wg*. La sobreexpresión generalizada de UAS-*pnr* por la línea c765 expande la expresión DC-*lacZ* hacia la zona lateral (A, punta de flecha) y produce su expresión ectópica débil en el compartimento anterior del territorio precursor del ala (A, asterisco). En estas condiciones, *wg* se expresa ectópicamente en el notum (B, corchetes). C. Fenotipo de las moscas c765 UAS-*pnr*. D-G Expresión de DC-*lacZ* y de *wg* en discos imaginales mutantes *pnr* de los genotipos indicados. H. Expresión de *wg* en un disco imaginal c734 UAS-*pnr*. I. Imagen confocal de un disco UAS-GFP/*pnr*^{MD237} teñido con anticuerpo anti Wg (canal rojo). (GFP, proteína fluorescente verde).

PARTE III

OTROS ELEMENTOS DEL PREPATRÓN. REGULACIÓN ENTRE LOS GENES DE PREPATRÓN.

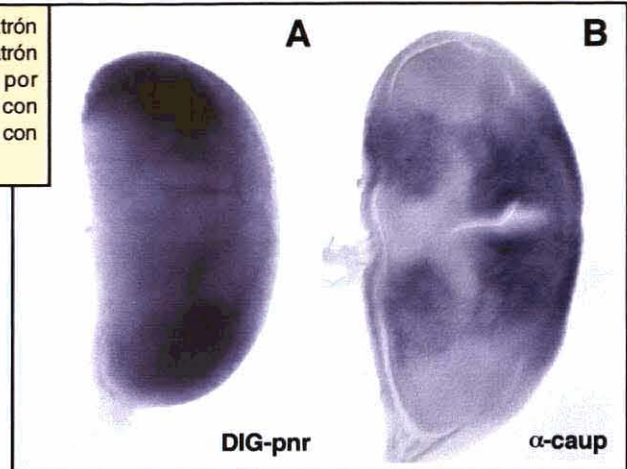
Hemos visto que la sobreexpresión generalizada de *pnr* expande la expresión DC-*lacZ* a varias regiones del disco imaginal. Sin embargo, no lo hace hacia el territorio dorsal del primordio. Esto puede deberse a la presencia en esta región del factor Ush que se expresa en un dominio ligeramente más restringido que el de *pnr* (Fig. 5D; Cubbada y cols., 1997). Como se ha comentado en la introducción, Haenlin y cols. (1997) han propuesto que Ush actuaría secuestrando o titulando a Pnr en la zona más dorsal del disco imaginal, mediante la formación de heterodímeros Pnr-Ush. En efecto, las mutaciones hipomorfas *ush* producen una expansión de la expresión dirigida por el enhancer DC hacia el territorio dorsal, mientras que la sobreexpresión de Ush en el territorio de *pnr* (*UAS-ush*; *pnr^{MD237}*) suprime la expresión mediada por el enhancer (Cubbada y cols., 1997). Por tanto, Ush actuaría como un regulador negativo de la expresión en el grupo proneural DC, antagonizando a uno de sus activadores, y de esta manera, establecería el límite dorsal del grupo proneural DC.

Sin embargo, este modelo de la función de Ush no explica las diferencias de expresión DC-*lacZ* entre discos *pnr^{D1}/pnr^{V1}* y *pnr^{D1}/+* (comparar Fig. 19D con Fig. 19F). La proteína mutante Pnr^{D1} posee una mutación puntual en uno de los dominios dedo de Zinc involucrado en la unión con Ush, pero tiene intactos los dominios implicados en la activación transcripcional (Fig. 4E). Así pues, en los discos *pnr^{D1}/pnr^{V1}* la expresión de DC-*lacZ* se expande dorsalmente (Fig. 19D), de acuerdo con la incapacidad de Ush para titular la forma Pnr^{D1}. Sin embargo, en los discos *pnr^{D1}/+* esta expansión no ocurre (Fig. 19F), a pesar de poseer más dosis de *pnr* potencialmente activadoras que los discos *pnr^{D1}/pnr^{V1}* (*pnr^{V1}* es un alelo fuertemente hipomorfo). En base a la diferencia entre ambas combinaciones mutantes (la presencia de una copia silvestre para el gen *pnr*, en lugar del alelo hipomorfo *pnr^{V1}*) proponemos que los dímeros Pnr-Ush pueden actuar, no solo como tituladores de la función activadora de *pnr*, sino también como represores de la transcripción mediada por el enhancer DC. Esta función represora de los dímeros Pnr-Ush podría además explicar la dualidad de la función de Pnr como activador y represor de *wg* que describimos a continuación.

Pannier activa y reprime a *wg* en el primordio de notum.

En el territorio de notum de los discos imaginales de tercer estadio larvario, la banda antero-posterior de Wg se encuentra sobre el límite lateral de expresión de *pnr* (Fig. 19I). La correspondencia tan precisa entre los contornos de expresión de ambos genes, sugiere una regulación mutua. Wg no parece regular a *pnr*, puesto que en discos *wg^{CX4}/wg^{CX3}* la expresión de *pnr* no se afecta (Fig. 20A). Sin embargo, Pnr si parece regular a *wg* puesto que como ya hemos mencionado anteriormente, la expresión de *wg* se altera drásticamente en distintas combinaciones mutantes para *pnr* (Fig. 7G-I; Calleja y cols., 1996).

Figura 20. Expresión de genes de prepatrón en discos mutantes *wg^{CX3}/wg^{CX4}*. El patrón de expresión de *pnr* (A), se reveló por hibridación *in situ* con sonda marcada con digoxigenina, y la de Caup (B) por tinción con anticuerpo específico.



De acuerdo con la localización de Wg en la región de máxima actividad de Pnr, en donde probablemente no existe titulación por Ush, hemos encontrado que Pnr activa a *wg*. Así, la sobreexpresión de *UAS-pnr*, bien de manera ubicua (línea c765, Fig. 19B) o más restringida (línea c734, Fig. 19H), activa ectópicamente la transcripción de *wg* en las áreas correspondientes del primordio de notum, a excepción de la zona más dorsal, probablemente debido a la presencia en esta región del antagonista Ush. Además, en discos mutantes para la combinación antimorfa dominante de falta de función *pnr^{VX1}/pnr^{V1}*, el marcador *wg-lacZ* no se expresa en el notum, mientras que en discos de genotipo *pnr^{D1}/pnr^{MD237}*, una combinación dominante de ganancia de función en la que no es posible la titulación por Ush, este marcador se sobreexpresa en toda la zona dorsal del disco (Fig. 7H; Calleja y cols., 1996).

En otros experimentos, en cambio, hemos detectado una actividad represora de Pnr sobre *wg*. Así, combinaciones hipomorfas fuertes, como *pnr^{MD237}/pnr^{VX6}* (Fig. 18F) o *pnr^{V1}/pnr^{VX6}* (no mostrado) muestran una expansión dorsal de la banda de *wg* que puede corregirse expresando *UAS-pnr* (discos *UAS-pnr*, *pnr^{MD237}/pnr^{VX6}*, Fig. 18G). Esta función represora de Pnr sobre *wg* parece estar restringida a la zona más dorsal del primordio de notum, lo que nos indujo a pensar en una posible participación de Ush en este efecto represor. En efecto, de manera similar a lo que ocurre con la expresión *DC-lacZ*, los discos *pnr^{D1}/+* muestran un patrón silvestre de *wg* (Fig. 19G) mientras que en los discos *pnr^{D1}/pnr^{V1}* este patrón se expande dorsalmente (Fig. 19E). Además, la expresión de *wg* se expande dorsalmente en combinaciones hipomorfas de *ush* y se elimina al sobreexpresar el transgén *UAS-ush* con la línea *pnr^{MD237}* (Marc Haenlin, comunicación personal). Todos estos datos indican que los heterodímeros Pnr-Ush actúan como represores transcripcionales tanto de *wg* como de *ac-sc* en la región más dorsal del notum.

PARTE IV

PREPATRÓN PARA EL GRUPO PRONEURAL DC EN EL EJE ANTERO-POSTERIOR.

Los experimentos anteriores indican que *pnr* y *ush* establecen las claves topográficas que definen el grupo proneural DC a lo largo del eje dorso-lateral. El enhancer DC debe recibir claves posicionales adicionales que delimiten su actividad en el eje antero-posterior. La presencia de dichas claves posicionales se pone de manifiesto en las condiciones de ganancia y pérdida de función de *pnr* y *ush*. Así, tanto la sobreexpresión ubicua de *UAS-pnr* (Fig. 19A), como la falta de función de *ush* (Cubbada y cols., 1997, y combinación *pnr^{D1}/pnr^{V1}* Fig. 19D) expanden la expresión de DC-*lacZ* lateral y dorsalmente, respectivamente, pero tan solo en una banda de células restringida a lo largo del eje antero-posterior. El gen *dpp*, debido a su cualidad de morfógeno y a su patrón de expresión restringido a lo largo de este eje, es un candidato a regular la expresión en el grupo proneural DC. Para explorar esta posibilidad realizamos algunos experimentos de sobreexpresión mediante la técnica GAL4/UAS.

Dpp afecta la expresión de DC-*lacZ*, así como el prepatrón general del disco imaginal.

En el territorio de notum de discos imaginales de tercer estadio, *dpp* se expresa en una banda discontinua de células inmediatamente anterior al borde de compartimento A/P (Sanicola y cols., 1995). El grupo proneural DC se encuentra situado en el compartimento anterior separado de la banda de expresión de *dpp* por unos cuantos diámetros celulares (Fig. 21A). Por tanto, es posible que el enhancer DC responda al gradiente de Dpp, activándose dentro de un rango de concentraciones definido de este morfógeno, tal como se ha descrito para los enhancers responsables de la activación de los genes *optomotor-blind* y *spalt* en el primordio de ala (Lecuit y cols., 1996; Nellen y cols., 1996). De ser así, un incremento en las concentraciones de dicho gradiente debería desplazar la posición del grupo DC hacia posiciones más anteriores. Examinamos la validez de esta hipótesis sobreexpresando *dpp* en distintos grados. Ello se consiguió mediante experimentos con varias líneas *UAS-dpp*, sometidos a diferentes temperaturas (se ha demostrado que el sistema GAL4/UAS actúa más eficientemente a 25°C que a 17°C), y usando también el transgén *UAS-*tkv*^{QD}*, una forma activada constitutivamente del receptor de tipo I para Dpp (Nellen y cols., 1996).

Una modificación drástica del gradiente de *dpp* se consigue sobreexpresando el transgén *UAS-dpp^s* de manera generalizada (línea c765). En este caso, y a 25°C se elimina completamente la expresión DC-*lacZ* y se produce un gran sobrecrecimiento del disco (no mostrado) que impide su desarrollo posterior, ya que las moscas mueren poco después de la pupación. En los experimentos a 17°C, la expresión DC-*lacZ* se reduce a unas pocas células del grupo proneural, y además aparece expresión ectópica

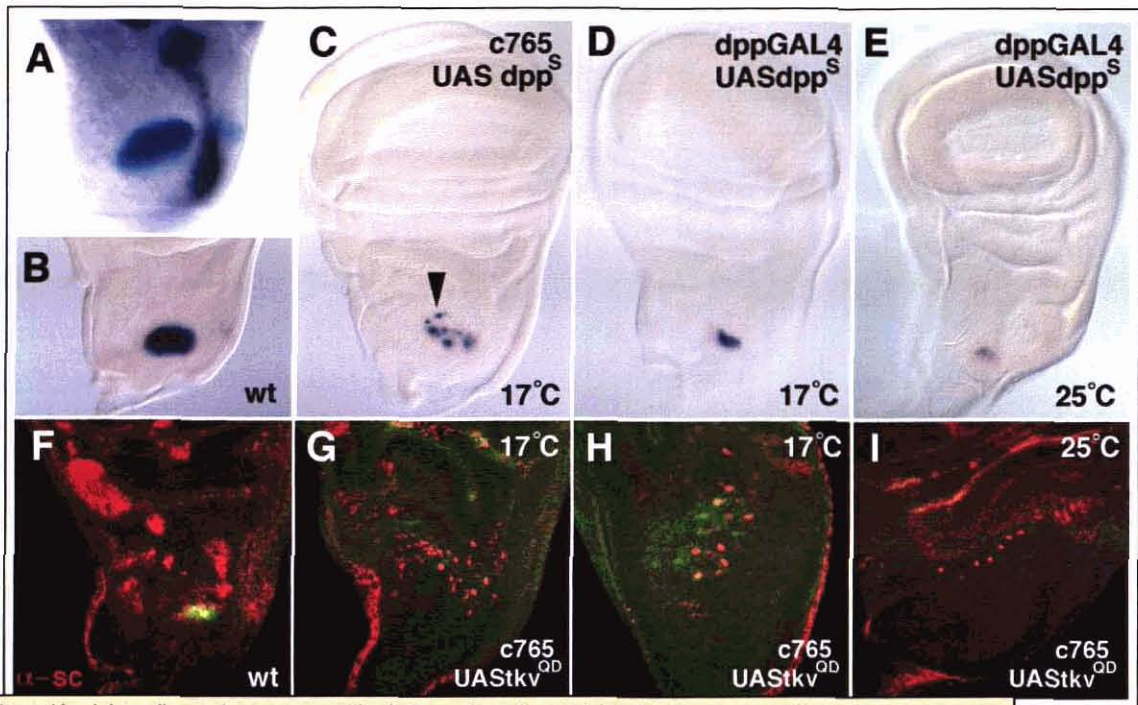


Figura 21. La alteración del gradiente de concentración de Dpp afecta la actividad *DC-lacZ* y el patrón de Sc en los discos imaginales. **A.** Expresión de *DC-lacZ* (azul) con respecto a la de *dpp* (púrpura) en un disco imaginal de tercer estadio larvario. **B-E** Expresión *DC-lacZ* en discos imaginales con gradientes de Dpp alterados mediante la sobreexpresión de diferentes transgenes con distintas líneas activadoras GAL4 y ensayados a 17°C o 25°C, según se indica en los paneles correspondientes. **F-I** Expresión de *DC-lacZ* (verde) y de Sc (rojo) en discos imaginales de los genotipos indicados y ensayados a la temperatura que se especifica en los paneles.

en la zona lateral inmediatamente anterior al grupo proneural DC (punta de flecha en la Fig. 21C). Los adultos resultantes tienen fenotipo de quetas extra en la región DC (Fig. 7F; Mullor y cols., 1997). La sobreexpresión de *UAS-tkv^{QD}* con la línea c765 tiene efectos similares a los obtenidos con el transgén *UAS-dpp^S*.

La sobreexpresión de *UAS-dpp^S* con la línea *dpp-GAL4* produce una modificación más sutil del gradiente de *dpp*, ya que altera dicho gradiente aumentando los niveles de producción en su fuente de origen. Estas condiciones también producen un sobrecrecimiento del disco imaginal y una disminución de la expresión dirigida por el enhancer DC, siendo estos efectos más acusados a 25°C (Fig. 21E) que a 17°C (Fig. 21D). Sin embargo, la posición del grupo proneural revelada por la expresión de *DC-lacZ*, no se modifica notablemente a ninguna de las dos temperaturas (Fig. 21D-E), y los adultos o son completamente normales (17°C) o tienen defectos en la región escutelar (25°C), pero no tienen el patrón de quetas DC alterado. La sobreexpresión, en experimentos similares, de otro transgén que produce menores niveles de Dpp (*UAS-dpp^W*) no tiene ningún efecto, ni sobre la expresión de *DC-lacZ*, ni sobre el fenotipo de las moscas resultantes (no mostrado).

Así pues, en base a nuestros resultados, si bien alteraciones en el gradiente de *dpp* pueden modificar la expresión de *DC-lacZ*, no parece que el gradiente de Dpp contribuya, a modo de morfógeno, a definir la posición del grupo proneural DC. Sin embargo recientemente, Tomoyasu y cols. (1998) han propuesto a *dpp* como parte

del prepatrón que define la posición del grupo proneural DC, actuando a modo de morfógeno. Dicha conclusión se deduce de experimentos de ganancia (*UAS-*tkv*^{QD}*) y pérdida de función para *dpp* en los que observaban la alteración del patrón de expresión dirigido por la construcción 5.7 kb DC publicada en (Gómez-Skarmeta y cols., 1995). Dada la discrepancia entre nuestros resultados y los obtenidos por estos investigadores, y considerando que la construcción 5.7kb DC contiene, además del enhancer DC, el enhancer que dirige la expresión en las CMOS, decidimos analizar la expresión de la proteína Sc en los discos *c765 UAS-*tkv*^{QD}*.

La expresión ubicua del receptor activado de Dpp altera drásticamente la expresión de Sc. Tanto a 17°C como a 25°C la expresión de Sc desaparece de todos los grupos proneurales del notum. Solo se distingue en células aisladas, que por sus niveles de expresión de Sc podrían corresponder a CMOS (Fig. 21F-I). En los experimentos a 17°C, estas células se encuentran alrededor de la región DC del disco imaginal en un grupo más o menos compacto, aunque distribuidas aleatoriamente y en número variable de disco a disco (Fig. 21G y H). En cambio a 25°C, las células tienden a distribuirse formando una hilera a lo largo del eje antero-posterior y a la altura del grupo proneural DC (Fig. 21I). Esta hilera es similar a la observada por Tomoyasu y cols. (1998) en las condiciones de sobreexpresión de sus experimentos, la cual ellos atribuyeron al enhancer DC (Fig. 7C). Sin embargo, en nuestros experimentos de sobreexpresión no hemos conseguido detectar expresión de Sc similar a la de los grupos proneurales, ni tampoco una correspondencia de esta hilera de células con una expresión de DC-*lacZ*.

Dada la alteración generalizada del patrón de Sc en los discos imaginales de la condición *c765 UAS-*tkv*^{QD}*, quisimos comprobar si la expresión de los genes de prepatrón *lro*, *wg* y *pnr* se encontraba alterada en estos discos. Así, comprobamos que tanto el patrón de Caupolican (uno de los genes del C-lro), como el de Wg se

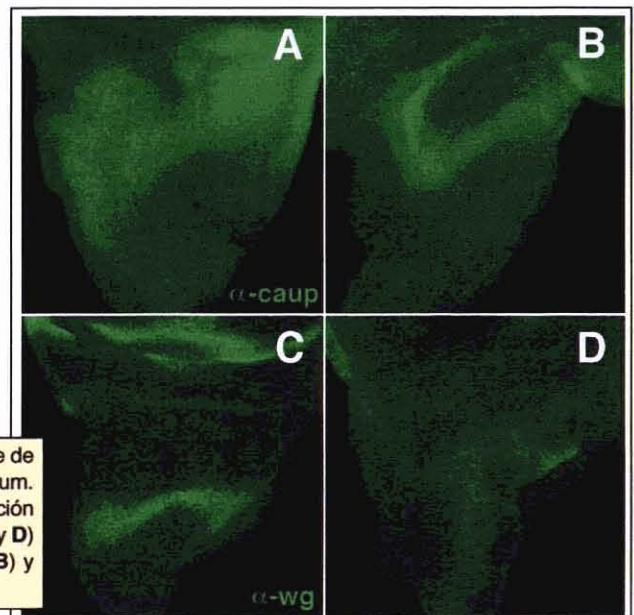


Figura 22. La modificación del gradiente de Dpp altera el prepatrón general del notum. Discos silvestres (A y C) y de la combinación *c765 UAS-*tkv*^{QD}* ensayados a 25°C (B y D) teñidos con anticuerpos anti Caup (A-B) y anti Wg (C-D).

modifican, siendo los efectos mayores a 25°C que a 17°C (Fig. 22). También el patrón de expresión de *pnr* parece estar afectado, aunque es difícil interpretar los resultados debido a la fuerte alteración de la morfología de los discos imaginales (no mostrado). La profunda alteración del prepatrón del disco en los experimentos de sobreexpresión de *dpp* podría explicar la ausencia de grupos proneurales y también la disminución de la expresión DC-*lacZ* en nuestros experimentos.

DISCUSIÓN

La expresión de *ac* y *sc* en los grupos proneurales depende de una batería de elementos reguladores de tipo enhancer. Para entender mejor el funcionamiento de estos enhancers y de qué manera están regulados por el conjunto de factores que forman el prepatrón de los discos imaginales, emprendimos la caracterización de dos fragmentos del CAS con actividad enhancer en grupos proneurales. Comenzamos por delimitar las secuencias mínimas para su funcionamiento.

En el caso del fragmento que poseía actividad enhancer en los grupos proneurales ANP, APA-tr1-tr2, Tgd, Rd y GSR pudimos diferenciar secuencias necesarias para la expresión en cada uno de estos grupos proneurales. Así, en el fragmento mínimo HC3.5ANP, que retenía actividad enhancer para todos estos grupos, las secuencias requeridas para la expresión en el grupo APA-tr1-tr2 se encontraron en un fragmento de 563 pb, las del grupo Rd en uno de 446 pb, las de los grupos ANP y Tgd en 634 pb y las del grupo GSR en 357 pb (Fig. 8). Este resultado sugiere que podría existir un elemento enhancer independiente para cada uno de estos grupos proneurales del disco imaginal, tal como se había propuesto anteriormente (Ruiz-Gómez y Modolell, 1987). Sin embargo, puede que varias secuencias enhancer aparentemente independientes necesiten de un contexto de ADN con unas características concretas, como por ejemplo una correcta conformación tridimensional. Con los experimentos realizados, no podemos excluir la posibilidad de que las secuencias enhancer identificadas en el fragmento HC3.5ANP compartan un contexto cromatínico común y, por tanto, que no tengan actividad enhancer al ensayarse aisladamente. Este fenómeno ha sido descrito para otros elementos enhancer, como por ejemplo para algunos elementos enhancer del gen *hairy* (Langeland y Carroll, 1993).

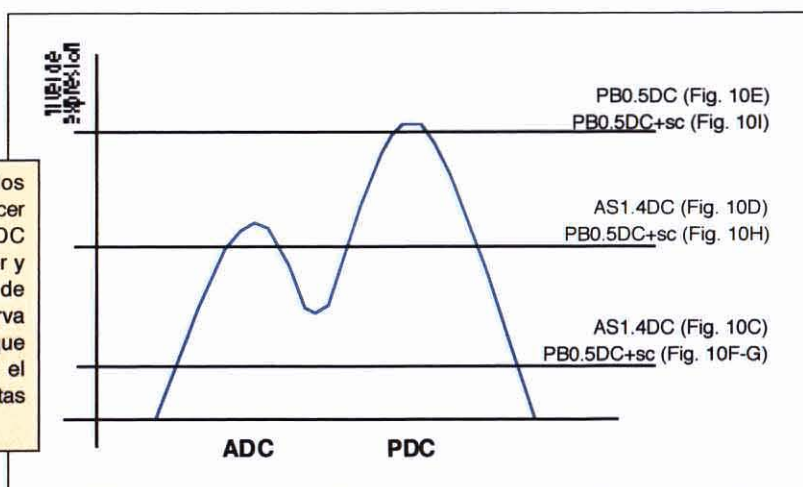
En el caso del enhancer para el grupo proneural DC, pudimos delimitar un fragmento mínimo de 1.4 kb capaz de dirigir la expresión en todas las células del grupo proneural. También detectamos actividad en un subfragmento de 0.5 kb, aunque su actividad en construcciones con el promotor heterólogo *hsp70* se limitó a la CMOS para la PDC. No obstante, este mismo fragmento de 0.5 kb, cuando se ensayó en construcciones con el promotor homólogo del gen *sc*, dirigió la expresión en prácticamente todo el grupo proneural DC (Fig. 10). Pensamos que este resultado refleja que los elementos enhancer precisan un contexto adecuado para su funcionamiento, que puede depender de la correcta interacción entre el enhancer y el promotor del gen al que regula. Así, el fragmento de 1.4 kb, ensayado en construcciones con promotores más débiles que el de *hsp70*, solamente dirige la expresión débilmente en la CMOS para la PDC (no mostrado). Otra observación que apoya la necesidad de un contexto óptimo para la actividad de los enhancers es la variabilidad en la actividad dirigida por un enhancer en diferentes líneas transformantes para una misma construcción (Fig. 10C-D y F-I),

fenómeno que se asocia a efectos de posición diferentes según el punto de inserción en el genoma del transgén analizado.

Los enhancers del CAS para la expresión en grupos proneurales dirigen niveles de expresión heterogéneos entre las células de un mismo grupo.

Hemos observado que cuando se altera el entorno óptimo para el funcionamiento de los enhancers, la expresión dirigida por estos se restringe a las CMOS de los grupos proneurales correspondientes (Fig. 8 y Fig. 10). Estos resultados sugieren que los enhancers dirigen más altos niveles de expresión en las CMOS que en el resto de las células del grupo proneural. Este parece ser el caso del enhancer DC, ya que la construcción AS1.4DC dirige una mayor expresión del marcador *lacZ* en las CMOS (Fig. 13A panel +/+). La expresión dirigida por las construcciones con el enhancer DC varía de unas líneas transformantes a otras: algunas dirigen expresión en todo el grupo proneural, otras en un grupo alrededor de la CMOS para la PDC y en la CMOS ADC; otras tan solo en un grupo PDC; y otras exclusivamente en la CMOS PDC (Fig. 10C-I). En base a estos resultados, resumimos la distribución de los niveles de expresión para el enhancer DC tal como se indica en la Fig. 23. Las expresiones dirigidas por las distintas construcciones DC podrían corresponder a diferentes puntos de corte en la curva de expresión (Fig. 23)

Figura 23. Esquema que representa los niveles de expresión dirigidos por el enhancer DC en el grupo proneural. ADC y PDC señalan la posición de las CMOS anterior y posterior respectivamente. Los puntos de corte de las líneas horizontales con la curva indican los niveles de expresión *lacZ* que dirigen las distintas construcciones con el enhancer DC. La expresión dirigida por estas construcciones se muestra en la Fig. 10.



La expresión dirigida en la CMOS PDC por la construcción PB0.5DC desaparece en la combinación mutante $sc^{10.1}$ (no mostrado), y lo mismo ocurre con la expresión en CMOS dirigida por el fragmento ANP-A (Fig. 11). Este resultado sugiere que de alguna manera, los procesos que median la determinación de las CMOS influyen en la expresión de los enhancers de grupo proneural. Una de las primeras características que diferencia a la CMOS del resto de las células del grupo es la acumulación de altos niveles de proteínas proneurales, lo cual se debe a un bucle de autoestimulación mediado por enhancers específicos (Culí y Modolell, 1998). El enhancer DC podría contener secuencias semejantes a las de estos enhancers de las CMOS y regularse de manera similar. De hecho, el fragmento PB0.5DC contiene una caja E y otra N

conservadas evolutivamente, que podrían ser funcionales y contribuir a la regulación de la expresión dirigida por el enhancer DC en las CMOS (también hay cajas E y N en la secuencia de la construcción ANP-A). No hemos profundizado en el estudio de la función de estas cajas. Así pues, no podemos hacer valoraciones concluyentes acerca de su posible papel en la regulación de la expresión heterogénea mediada por el enhancer DC. A pesar de ello, parece poco probable que la expresión dirigida por los enhancers en las CMOS se deba a un comportamiento anómalo de las cajas E en estas construcciones, ya que la expresión no se produce en todas las CMOS del disco imaginal, sino tan solo en las correspondientes al grupo proneural para el cual el enhancer es específico.

La expresión dirigida por la construcción AS1.4DC no se altera en mutantes *sc^{10.1}*, como tampoco lo hace la dirigida por el fragmento de 6 kb con los enhancers ANP, APA-tr1-tr2, Tgd, Rd y GSR (Fig. 11 y Gómez-Skarmeta y cols., 1995). Por tanto, los enhancers de grupo proneural dirigen una expresión en los grupos proneurales que no depende de la determinación de las CMOS. Cabe preguntarse de qué depende la expresión heterogénea dirigida por los enhancers, al menos por el enhancer DC. Si dependiera de los elementos de patrón existentes en el disco imaginal, estos podrían contribuir a explicar por qué las CMOS, que se seleccionan de entre las células con mayores niveles de proteínas proneurales, aparecen siempre en posiciones precisas dentro del grupo (Cubas y cols., 1991).

Análisis de las secuencias correspondientes a los enhancers de los grupos proneurales DC, ANP, APA-tr1-tr2, Tgd, Rd, y GSR.

Con el fin de obtener indicios sobre los factores de transcripción que participan en el control transcripcional a través de los enhancers, secuenciamos los elementos mínimos que conseguimos delimitar, y buscamos en estas secuencias sitios consensos de unión para factores transcripcionales de familias conocidas. Así, encontramos varias cajas TAAT, cajas GATA, cajas A, E y N (Fig. 9). En la mayor parte de los casos no hemos estudiado su posible importancia funcional *in vivo*, por tanto sólo podemos especular sobre los factores de transcripción que puedan actuar a través de ellas. Las proteínas Iro podrían unirse a algunas de las cajas TAAT del enhancer ANP-APA, tr1, tr2-Tgd-Rd-GSR, sin embargo ninguna de estas cajas tiene una secuencia flanqueante similar a la que se une la proteína Ara en el enhancer L3-TSM (Gómez-Skarmeta y cols., 1996).

En el caso del enhancer DC, comparamos su secuencia con la de la región homóloga en *D. virilis* para obtener indicios sobre la importancia funcional de los sitios consenso que encontramos en la secuencia. En base a esta comparación analizamos la función de algunas cajas consenso. Así, la mutagénesis de la caja TAAT en la posición 1262 de la secuencia (subrayada en la Fig. 12) elimina completamente la actividad DC-

lacZ. Este resultado sugiere que algún factor con homeodominio activa la expresión en el grupo proneural DC, sin embargo desconocemos qué factores pueden estar mediando esta activación. También estudiamos la funcionalidad de las cajas GATA presentes en la secuencia.

Pnr se une al enhancer DC y regula directamente su actividad.

En el enhancer DC encontramos 7 cajas GATA, que se presentaban como posibles sitios de unión para la proteína Pnr. Analizamos la importancia funcional de estas cajas en experimentos de mutagénesis y, en colaboración con Philippe Romain, su capacidad para mediar la regulación del enhancer DC por Pnr. Así, determinamos que estas cajas se requieren para la actividad DC-*lacZ in vivo* (Fig. 14A-C) y también, en experimentos de transfección en células de pollo, para activar un gen marcador de manera dependiente de Pnr (Fig. 14F). Estos resultados, junto con la observación de que algunas de las cajas GATA unen Pnr en experimentos de retardo en gel (Fig. 14D), indican que Pnr controla directamente la expresión de *ac* y *sc* en el grupo proneural DC mediante su unión directa al enhancer correspondiente.

No todas las cajas GATA presentes en el enhancer parecen tener la misma importancia funcional como mediadoras de la activación por Pnr. Así, los fragmentos AP0.5DC y P0.5DC (con 1 y 3 cajas GATA respectivamente) no tienen actividad DC-*lacZ in vivo*, ni tampoco en experimentos de transfección (no mostrado). Por otro lado, a pesar de que Pnr se une a la caja GATA1 en experimentos de retardo en gel, esta caja no es funcional en experimentos de transfección y su eliminación *in vivo*, no tiene ningún efecto sobre la actividad DC-*lacZ* (no mostrado y Fig. 14A). Todo ello indica que el contexto en el que se encuentra el sitio GATA influye en su función.

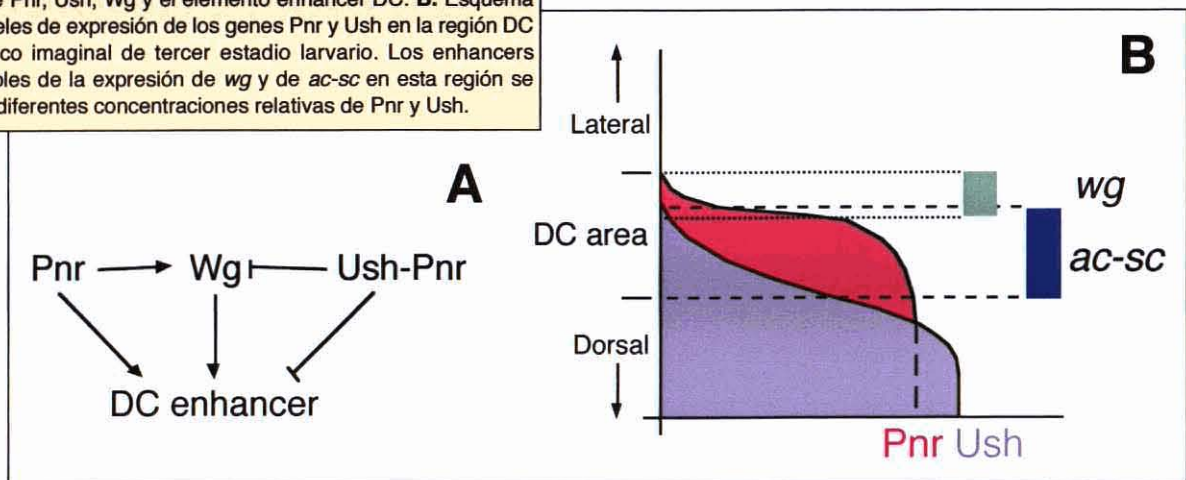
Pnr y Ush definen la localización del grupo proneural DC en el eje dorso-lateral.

En los discos imaginales de tercer estadio, *pnr* se expresa en la región más dorsal del territorio de notum, un área que incluye el grupo proneural DC (Fig. 13C). Dicha expresión se requiere para la correcta activación mediada por el enhancer DC, ya que condiciones mutantes hipomorfas para *pnr* producen la disminución o eliminación de la actividad DC-*lacZ* (Fig. 13A y B). En este trabajo demostramos que el borde lateral de expresión de *pnr* delimita la posición del grupo proneural DC lateralmente, ya que la sobreexpresión generalizada de este gen mediante un transgén *UAS-pnr*, expande el territorio DC-*lacZ* solamente hacia regiones más laterales del disco (Fig. 19A).

Se había descrito previamente que el límite dorsal del grupo proneural DC se establecía gracias a Ush, un antagonista de la función de Pnr que se expresa en la región más dorsal del territorio de notum (Cubbada y cols., 1997). Estos investigadores propusieron que Ush actuaría formando heterodímeros con Pnr y titularía su función

activadora (Cubbada y cols., 1997; Haenlin y cols., 1997). Algunos de nuestros resultados están de acuerdo con esta hipótesis, ya que en la combinación mutante *pnr^{D1}/pnr^{V1}*, en la cual Ush no puede titular la proteína Pnr presente (las mutaciones *pnr^D* codifican proteínas con los dominios de interacción con Ush alterados), se produce una expansión dorsal de la actividad DC-*lacZ* (Fig. 19D). Sin embargo, nuestros resultados también sugieren que Ush no sólo actúa como titular de la función de Pnr, sino que ambas proteínas participan activamente reprimiendo la actividad DC-*lacZ* en la región más dorsal del territorio de notum (Fig. 24). Esta sugerencia se fundamenta en dos observaciones: por un lado, la expresión DC-*lacZ* no se expande dorsalmente en discos de la combinación *pnr^{D1}/+*, una combinación teóricamente menos hipomorfa que *pnr^{D1}/pnr^{V1}* (Fig. 19F y D); y por otro lado, ninguna de las condiciones de sobreexpresión del transgén *UAS-pnr*, ni siquiera las más extremas (*UAS-pnr/UAS-pnr*, *pnr^{MD237}* a 29°C), pudieron contrarrestar la titulación por Ush en el territorio más dorsal del disco (no mostrado).

Figura 24. Modelo del prepatrón en el eje dorso-lateral para la región DC del notum. **A.** Resumen de las interacciones propuestas en esta tesis entre Pnr, Ush, Wg y el elemento enhancer DC. **B.** Esquema de los niveles de expresión de los genes Pnr y Ush en la región DC de un disco imaginal de tercer estadio larvario. Los enhancers responsables de la expresión de *wg* y de *ac-sc* en esta región se activan a diferentes concentraciones relativas de Pnr y Ush.



Wg es solamente permisivo para la activación génica en el grupo proneural DC.

En los discos imaginales de tercer estadio larvario, el grupo proneural DC está localizado dorsalmente con respecto a la banda de expresión de Wg (Fig. 15A; Phillips y Whittle, 1993). Dicha localización, junto con el hecho de que combinaciones hipomorfas de *wg* disminuyen la expresión de los genes proneurales en el grupo DC y suprimen el desarrollo de OSs en esta zona, ha propiciado la hipótesis de que Wg es uno de los factores de prepatrón que determinan la localización de este grupo proneural a lo largo del eje dorso-lateral (Phillips y Whittle, 1993; Tomoyasu y cols., 1998). Sin embargo, en este trabajo demostramos que, si bien *wg* es necesario para una correcta activación del enhancer DC, el gradiente de proteína Wg no determina la posición del grupo proneural DC. Así, una modificación del gradiente de Wg, bien mediante experimentos de sobreexpresión (Fig. 16), mediante la generación de clones para el

alelo nulo *wg^{CX4}* (Fig. 15C), o la que se produce en la combinación hipomorfa *wg^{CX3}/wg^{CX4}* (Fig. 15B), no modifica la posición de la expresión *DC-lacZ*, aunque si su extensión. Por tanto, Wg desempeña un papel permisivo en la expresión génica en el grupo proneural DC.

Con toda probabilidad, la activación de *DC-lacZ* por Wg está mediada por los componentes de su vía de transducción intracelular, ya que la sobreexpresión en los discos imaginales de la forma dominante negativa del factor dTFC, un factor de transcripción efector de la vía, reduce la expresión *DC-lacZ* (Fig. 17C). El enhancer DC contiene varios sitios similares al consenso de unión descrito para dTCF y además, varias regiones del enhancer unen la proteína dTCF en experimentos de retardo en gel (Fig. 17A y B). Así pues, parece probable que dTCF se una *in vivo* al enhancer DC y medie el efecto de Wg sobre la expresión en el grupo proneural DC.

Control del enhancer DC por la vía de Dpp.

En ninguno de nuestros experimentos de sobreexpresión o de falta de función que alteran el prepatrón en el eje dorso-lateral, hemos podido observar una modificación de la actividad *DC-lacZ* a lo largo del eje antero-posterior (Fig. 19A y D). Esta observación indica la existencia de un sistema de prepatrón a lo largo del eje antero-posterior, relativamente independiente del que establece las claves posicionales dorso-laterales. La proteína secretable Dpp se expresa en una banda de células a lo largo del borde de compartimento antero-posterior, y difunde a partir de esta fuente creando un gradiente que, en el territorio precursor del ala, tiene actividad morfogenética promoviendo la expresión de distintos genes en células situadas a diferentes distancias con respecto a la fuente de Dpp (de Celis y cols., 1996; Grimm y Pflugfelder, 1996; Lecuit y cols., 1996; Nellen y cols., 1996; Kim y cols., 1997). Realizamos una serie de experimentos de sobreexpresión con transgenes *UAS-dpp* y *UAS-*tkv*^{QD}* para comprobar si Dpp actúa como un morfógeno con respecto a la expresión *DC-lacZ* y establece su posición en el eje antero-posterior.

En ninguno de nuestros experimentos se observó una expansión o desplazamiento de la expresión *DC-lacZ* hacia el territorio anterior del disco imaginal al modificar el gradiente de Dpp incrementando sus concentraciones. Más bien al contrario, se observó una disminución de la expresión *DC-lacZ* (Fig. 21). Estos resultados contradicen los obtenidos por Tomoyasu y cols. (1998) (Fig. 7C), y por ello comprobamos el patrón de expresión de Sc en discos de genotipo *c765 UAS-*tkv*^{QD}*, una condición de activación de la vía de Dpp prácticamente igual a la utilizada por estos investigadores. Encontramos que en estas condiciones la expresión de Sc en grupos proneurales desaparece del territorio del notum y en cambio aparece una hilera de células aisladas que expresan altos niveles de Sc y que podrían corresponder a CMOS (Fig. 21G-I). También observamos que estas condiciones alteran drásticamente la expresión de

varios genes de prepatrón como *caup* y *wg* (Fig. 22). Por tanto creemos que el gradiente de Dpp afecta la expresión en el grupo proneural DC indirectamente, debido a su capacidad de regular tanto el crecimiento como la formación del prepatrón de los discos imaginales.

Regulación entre Pnr, Ush y Wg.

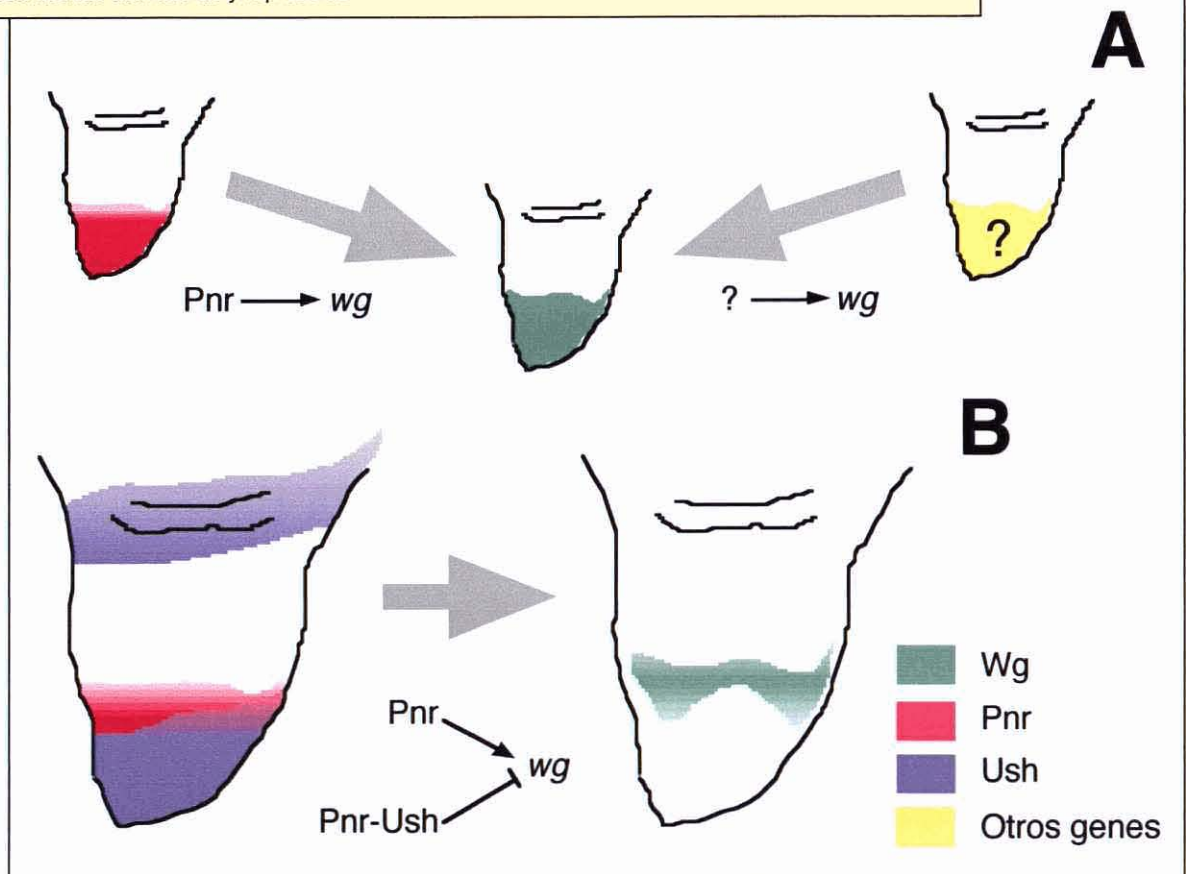
En los discos imaginales de tercer estadio, la banda de células que acumulan altas concentraciones de Wg coincide con el límite lateral de expresión de *pnr* (Fig. 19I). Estos patrones de expresión coincidentes sugieren una regulación cruzada entre *pnr* y *wg*. Calleja y cols. en 1996, en base a la alteración de la expresión de *wg-lacZ* en mutantes *pnr*, sugerían que Pnr activa *wg* (Fig. 7; Calleja y cols., 1996)). En este trabajo hemos descrito resultados adicionales que confirman a Pnr como activador de *wg*. Sin embargo, también hemos detectado una función de Pnr como represor transcripcional de *wg*. Así, en combinaciones hipomorfas fuertes como *pnr^{VX6}/pnr^{MD237}* o *pnr^{VX6}/pnr^{V1}* la banda de *wg* se expande dorsalmente (Fig. 18F) y esta expansión desaparece al sobreexpresar el transgén *UAS-pnr* (Fig. 18G). También hemos observado que en combinaciones mutantes que afectan la interacción Pnr-Ush, como *pnr^{D1}/pnr^{V1}* (Fig. 19E) o *ush^{SW42}/ush^{TgR+1}* (Marc Haenlin, comunicación personal), se elimina la represión y *wg* se expande hacia el territorio dorsal. En base a estos resultados proponemos que Pnr lleva a cabo una función represora en colaboración con Ush. Este mecanismo represor controlaría la expresión de *wg* y también la dirigida por el enhancer DC.

Ignoramos el mecanismo por el cual los dímeros Pnr-Ush reprimen la transcripción. Quizá la proteína Ush posea algún dominio represor, o quizá dichos dímeros actúen bloqueando los sitios necesarios para la activación transcripcional por Pnr, uniéndose a las mismas cajas GATA. Nuestros resultados indican que la función represora y activadora de Pnr contribuyen de manera diferente a la regulación del enhancer DC y a la de *wg*. Así, el mutante *pnr^{D1}/+* presenta un patrón de expresión normal de *wg* y una expresión DC-*lacZ* ligeramente expandida (Fig. 19G y F). Por otro lado, la sobreexpresión de *UAS-pnr* en un mutante *pnr^{VX6}/pnr^{MD237}* restringe la banda de *wg* a un dominio menor que el de los discos silvestres, mientras que el territorio DC-*lacZ* es ligeramente más grande de lo normal (Fig. 18G y C). Creemos que estas diferencias pueden ser reflejo de distintas afinidades de Pnr y de los dímeros Pnr-Ush para las secuencias del enhancer DC y las de el/los enhancer/s que controlan la expresión de Wg en el notum.

La expresión de *wg* comienza al principio del tercer estadio larvario en todo el territorio dorsal del notum, y posteriormente se restringe a la banda antero-posterior que se observa en discos tardíos de tercer estadio (Fig. 6; Couso y cols., 1993; Phillips y Whittle, 1993). Dado que Pnr controla tanto positiva como negativamente esta

expresión, creemos que la modulación de la interacción Pnr-Ush durante el tercer estadio larvario podría ser importante como elemento de prepatrón para la expresión de *wg*. Dos factores pueden modular la actividad represora de Pnr: la presencia de Ush (Marc Haenlin, comunicación personal); y la cantidad relativa de esta proteína con respecto a Pnr, ya que bajas dosis de Pnr permiten la activación de *wg* pero no su represión (Fig. 18F), mientras que las altas dosis potencian la represión más que la activación (Fig. 18G). En base a estas observaciones proponemos que en los discos imaginales de tercer estadio temprano, Pnr activaría inicialmente la expresión de *wg* en todo el territorio dorsal (Fig. 25A izquierda). Posteriormente, bien el comienzo de expresión de *ush* o bien un incremento en los niveles de expresión de Pnr, determinarían la restricción de dicho territorio (Fig. 25B). Alternativamente, la expresión de *wg* en el notum podría ocurrir en dos fases: inicialmente algún factor de prepatrón temprano se encargaría de activar *wg* por todo el territorio dorsal (Fig. 25A derecha) y posteriormente Pnr intervendría en una segunda fase de mantenimiento de esta expresión, activando *wg* en la banda más lateral en donde Ush no está presente, y reprimiendo su expresión en el territorio más dorsal (Fig. 25B).

Figura 25. Modelos para la regulación de *wg* durante el tercer estadio larvario. **A.** En discos imaginales tempranos, *wg* se expresaría en todo el territorio dorsal del notum activado por Pnr (izquierda) y/o por algún gen desconocido (derecha). **B.** En discos tardíos, la expresión de *wg* se restringe a una banda definida dorso-lateralmente por la presencia de Pnr y Ush. Las interacciones entre *wg* y las proteínas que lo regulan se indican con flechas activadoras y represoras.



Jerarquía de los genes de prepatrón en la región DC.

El entramado de interacciones entre los genes que se expresan en el territorio precursor del notum es en la actualidad casi completamente desconocido. En este trabajo hemos intentado esclarecer algunas de estas interacciones que contribuyen a definir la región DC del notum. Así, hemos observado la existencia de una jerarquía entre los genes de prepatrón.

A lo largo del eje dorso-lateral, *Pnr* y *Ush* establecen las claves posicionales para la localización del grupo proneural DC y también controlan el patrón de expresión de *wg*, el cual es a su vez requerido para la especificación de la región DC (Fig. 24). Hemos mostrado que a pesar de la regulación existente entre estos dos genes, ambos contribuyen separadamente a la activación de *DC-lacZ*, *Wg* de una manera permisiva y *Pnr* de modo topográficamente informativo. El papel permisivo de *Wg*, así como la observación de que *Wg* no afecta el prepatrón general del notum (Fig. 20), contrasta con el papel que este gen desempeña en el territorio precursor del ala, en donde su gradiente de concentración es decisivo para la activación de varios genes (Phillips y Whittle, 1993; Couso y cols., 1994; Zecca y cols., 1996; Neumann y Cohen, 1997; Cadigan y cols., 1998).

Los factores que controlan directamente el patrón de *ac-sc* en el notum a lo largo del eje antero-posterior se desconocen. Uno de ellos podría ser la expresión del gen *en* en el compartimento posterior del disco imaginal, ya que todos los grupos proneurales se encuentran en el compartimento anterior del disco (Cubas y cols., 1991). Además, en nuestros experimentos de sobreexpresión con *UAS-pnr*, la expresión *DC-lacZ* se expande a varias zonas del disco imaginal, pero en ningún caso al compartimento posterior (Fig. 19A). Estos datos sugieren que *en* podría ser un represor de la expresión de los enhancers de grupo proneural. Aparte de esta restricción, evidentemente deben existir más claves que establezcan las coordenadas A/P a lo largo del compartimento anterior, claves que probablemente dependan del establecimiento del borde A/P. Nuestros resultados sugieren que estas claves A/P son relativamente independientes de las que establecen el eje dorso-lateral.

En el disco de ala, el gradiente de *Dpp* se establece como consecuencia de interacciones entre las células a ambos lados del borde A/P (revisado en Blair, 1995). Hemos observado que un aumento en las concentraciones o señalización de *Dpp* altera drásticamente el patrón de expresión de *ac* y *sc*. Sin embargo, este efecto no parece que se deba a una simple acción en la localización de los grupos proneurales. En estos experimentos se produce una modificación del prepatrón general del disco imaginal conforme con una función organizadora general de *Dpp* en el disco imaginal, tal como ocurre en el territorio precursor del ala. En este territorio, *Dpp* actúa como un morfógeno especificando la activación de distintos genes en diferentes posiciones en

función de la concentración de Dpp (de Celis y cols., 1996; Grimm y Pflugfelder, 1996; Lecuit y cols., 1996; Nellen y cols., 1996; Kim y cols., 1997). Sin embargo, en el territorio del notum es improbable que esto ocurra así, ya que Dpp parece controlar la expresión de genes con patrones restringidos a lo largo del eje dorso-lateral, perpendiculares al eje A/P de expresión de Dpp. El mecanismo mediante el cual Dpp controla el prepatrón debe ser bastante complejo e involucrar la interacción con otras claves del prepatrón, ya que clones de falta de función para el receptor de Dpp *tkv*, tienen efectos diferentes sobre la expresión de genes de prepatrón dependiendo de la zona del disco imaginal en la que estos se encuentran (Fig. 7D y E; Sato y cols., 1999). Todos estos datos sugieren que Dpp desempeña un papel organizador temprano y general en el territorio de notum del disco imaginal.

CONCLUSIONES

1. Los enhancers del CAS para la expresión en los grupos proneurales ANP, APA-tr1-tr2, Tgd, Rd y GSR se encuentran en un fragmento mínimo de 3.5 kb. Dentro de este fragmento existen secuencias individuales implicadas, cada una de ellas, en dirigir la expresión génica en solamente uno de estos grupos proneurales.

2. El enhancer para la expresión en el grupo proneural DC se encuentra en un fragmento mínimo de 1.4 kb. Este fragmento puede dividirse en tres porciones en función de la conservación interespecífica de su secuencia con la de la región homóloga de *D. virilis*. La porción 3' terminal contiene toda la información posicional necesaria para la expresión en el grupo DC. Las otras dos porciones deben contener secuencias adicionales requeridas para potenciar los niveles de expresión.

3. Los enhancers de grupo proneural, al menos el DC, dirigen niveles de expresión heterogéneos entre las células de un grupo proneural. Estos niveles podrían ser determinantes para la posición en la que se especifican las CMOS.

4. Pnr se une a algunas de las cajas GATA del enhancer DC y así participa en la activación de *ac* y *sc* en este grupo proneural. El patrón de expresión restringido de *pnr* determina el límite lateral del grupo proneural DC.

5. Ush define el límite dorsal del grupo proneural DC. Ello lo hace en colaboración con Pnr, probablemente formando heterodímeros que reprimen la transcripción en la región más dorsal del notum.

6. En contra de anteriores sugerencias, Wg no especifica la localización del grupo proneural DC. Wg únicamente tiene un papel permisivo en la activación transcripcional de este enhancer. Esta activación está probablemente mediada por la unión al enhancer del factor de transcripción dTCF-Arm, efector de la vía de transducción de Wg.

7. El patrón de expresión restringido de Pnr determina el límite lateral de expresión de *wg* en el notum. Pnr, en colaboración con Ush también establece el límite dorsal de la banda de Wg, reprimiendo su expresión en el territorio más dorsal del disco imaginal. Este mecanismo de regulación podría ser importante para la regulación espacio/temporal de *wg* a lo largo del tercer estadio larvario.

8. El gradiente de Dpp no contribuye directamente a definir la posición del grupo proneural DC en el eje antero-posterior. La desaparición de la expresión de los genes proneurales que se produce al incrementar la concentración o señalización de Dpp se debe, probablemente, a la alteración del prepatrón general del disco imaginal.


```

1  GTCGACGGTATCGATAAGCTTTATTTGAATAATGTCTAATATTTTCCAAACAATAACCCAAATTTGGCAATCACGAGGGTCGTAATCGAACGACTTTACT
101 AATTTCTTCCACCAAGTAATAATTACAGCGATTTCGGTCGGAAGAAAGGCTTTTCATGACAGTCTTAAGGCTCATGCCTGCAAGGATTTTAAATCATCGACAT
201 GCCATTTAGTATGCTGCAATAATATATTTGCGAAACACTTTCCCATTTGTAAAGCATGCTTTTTCAGCAGGAGCAAAATATATTTTACTTTTCGGATTTTA
301 GCTAGAGAGATATTTAACTACTTTTGTATGATTAAAGAAACATTTAAGCGTGATCAAAAATGTTTCATGCCCTACGTTTAAAGCTAATATTTATTTGAAAGT
401 CCATTTTCCAGGGTATTCCTGTAGTGTAGTACCGCAACAGCGCGTGTGGCGCGCCACAGCGATCACAGCAAGTTTCATTGCATACATTTTCAGGCAGTT
501 CCAAGAAAGACGCAACAAATTTCTTTACTCTATAAATTTTAAAGAACTATACAAATATAGTCTCAAATTCAGTGGAAAGCTATGAAATACAAACATTATCT
601 GGCCTATATATATATATATATATATATATATATATCTTTTCTTGTATCATATGAATATGAATAGATGATTACGGGCTGCAGCATTCATTTCAGTAAAAA
701 ACTGTTTGACTGGCGGCCCATTCATTTCATGACACAGCGCCGCTCTAGAGGCTGCTTCATCTGAGACGCGGGCTGGTGCAGAAACGGAAGGGGGGG
801 GGATGAGGGGTTTACAAAAATGATGGCTGTGCCAAAAATTCACACATAATTACAAGTGAGAAGCTGAGGAGGAAACAGCAACAGGGAATTCGAGCTGGGC
901 TGCTTTTCGGCCCGCTTAGAGACTTGATTATGTACAGACTGGCGGGGCTGGCGGGGCTGCTGCTGCCGTTATGGGCGTGGCATACGGCCCGCTTGTG
1001 ACTTTTCGCGCCAGCGGAAACAAAACACTACGCCAAAAGCGCAACAAGAAACAAACAAACAGGCGAAAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
1101 CGTTGACGGCGCGCATTTATTACTTTTGTATTACGAATACGCGCATTTACCCCAgCCCCCGGGCGGCTCCGGCCCGGACCTGGCGGTGGCTGCT
1201 GTGCGAAACACTTAAAGCGCAAAAGTGAGCAAAACACACTTGTCTATTAAACGCGTCTGCCCTCGCGGACACAGGCGAGGCTCGGGGTCTAAGTCGGG
1301 CTCGGGCTCGGGGCTGCCGTTTGTACAGTTCGTGAAGTGAATCTGGCAGCGGATTCGCGGACTGTCTGAAAAATTTATTGAAAGCATTAAAGAGCC
1401 GCGGCACGTTAACGAGAAACGTACGCGAATTTGGACAGCCCGAGCCCGAGCCCGAGCCAGCAGTATCCAGCGACAGCGACAGAGTCCCTGCC
1501 CTGTCGAGCTAAGCACAACGCATACGTGTGGCTAATTTGCGGTTGCCGAATGATGATTTAGATAGGAGCGCGCAGATCAGCACAACAGCAGTGAAGA
1601 TTCAGCAGCAGCCAAAAAAGAAAGAAAGAAAGCAACCCGCATGCAAAATATAGAAATTTTCATCTGGCGCTGGCAGAGCTTAAACAAAT
1701 ATTAGATAGTCTGCGATAACTGGCCAGGACTATCTAGTTTCAGCTGCAACGCATATTCAAATGCAATAAATCGCGAGCGGTTTTAGTTTCCAAAC
1801 AcccctaaaaaCAAAAAACAACATTTATATGTATATAAAAAAGCAATTTTCTGGTCTGCCAAAATGCAATACACTTAAAAATCTGTGAAGCG
1901 TTGCTCTTTCAAAGCAAGCTGATCGCAATCGTGGGTATTTATAGTACAGGAATATATATATATATATATAGTACAGGAATATAGAATATATAGCAGGCGGATG
2001 TGACTGTTGATCAATGCTGGAATTCCTATGCAAAACAGATACCTTTAGTCCACAATGGATTTCAGAACTATATATAAACTTATTCCAATTGAGTTGAGATA
2101 TTTACGGGACAAATATACAGCTATATATCTACTATACGATATAGTTAAACGATATTTGGTCAGACTTTGCAGAGTTTGTAGCAAAATGCTTGGCCATCA
2201 TATATGTTATATATATCTTTCGATCAACGGTCAACTCAGATGTATGACAAGTTCAATTGAGCAAGCTTCGCTGAGAATAGTTGTTGAGACAGATAGAGAT
2301 TTATAGTTAGAGATTAAGTCAATTCAGCTCTACACTTTGATCAAAATATACAAAAAGAAAGTCAAGTTAAATGCGTTTACACAGCCGCTGATTAGTTCCT
2401 ATGCTCTCTGCTAGAGATTTATAAATGCGCAAAACGCTTTTCAGTTTCGGAATTCGCAAGTCTGCAGGAAGCGCAACAGTAAAGTAAAGAGAGAGAGAGAGAG
2501 AGAGAGAAAAAAGAAAGAAACCAATTGCTAATTTAATGCTAGACGGCGTTAATATCAAGTGCCTATTATGGCTTCGCTTTTGGGCCAGGCACTGG
2601 CAGGCGATGCTTTAACTGATGAGCCAGACTGCCAGCGGTATAGCTATATAAAGAGTGACAGCGGTAAAAGGGGGGGCACTCTGTAATACAGCTAC
2701 TTAATGGAAGCGCCAAACAGCAGCGGGGCTTTGTGGCGTTTGGGGCGTGGCACTTGAGTGCAATTCGTACCTGCTGTGACAGCTGTTGCCATGTTGC
2801 CAACAAGACGACCGCTCAGATGAGAGGAGACAAAGCAAGTTTCGCTGCTTAAGTCAATTCGCTTTGTTAAGTTCGTTGCTTAAGTCACTTCACCTGA
2901 TCCCCAGAGCTGCTGAGCTCGCTGTTTCAATTAAAAGCGAGCTAATTTATCGAACATGCAACAAATTTATGCGCATTTAACAACCTGTAATTTGA
3001 TTGTACAAAAGTGAAAGCGTGAATGCGGCCAACAGGCAACAGGCAACAGGCAACAGGCAACAGGCAACAGGCAACAGGCAACAGGCAACAGGCAACAGGCAAC
3101 AGTACTTGCGAATAGCTCGCATTGTGGCGTCTTAGCCAGACGCTGTTGCGCACAAAAAGAAAGTGACGCTTAATCGCTCAATTCACGCGGCTGCGACAA
3201 ACAGAAACCGACAAAAATGTTTAAATATTTCTTATTTTTCCTTTCCTGCGGCGAGAGGATTTATTTGGCTCAAGCTGAATTTGGGCGGGCAGGCGCA
3301 GGGGCTGGCCGAGCGCAATTTAAATGGCCAGCGGATGCTGCGAAATATCTTGATTGACATTTTATGCTTTTAAATGAAAGCAATCTCAAAGGACA
3401 CAAACACACAAATTTGTCGATCGCAACGCATTCGCCCGCGCAGCAGCCACATTTGCCCTCAGCGTGGTTGGTGGCAGGCGCATAAAAATTTGTA
3501 TGTGATAGCCGAGCGGACGAGCAGCAGCAATGGAGCGAGAGTCAAGTCAAGAGAGCAAGTGTAGCGTGTAGCCACACAAAGCAACAAACAGGATAC
3601 AATGTATCTTGGCTATCTGCGGCGAGTAGAGCTGACACGCAAGCTGTGCAACTAATGTATCTGCTGCTGCGCCAGAGACCAAGCGAGATGCACTC
3701 GGACAGCTCGAATATACGAATACCTCTCGCTTAGGTCATTGGCAACGACTCAAATATACCACTACATAGTCCAAGGATTCGAGAAAGATTGAAAAAGAA
3801 ATTATCTATCGATGACCTTGATATAAATTTGCATAAATATGCTTGTCTAGTTCTTATATTTTAACTAGAAATGTATACGCTTCATTAATAATTA
3901 AGAATGATTGCTTAAATATAGCCGAAATTCAAATTTGAACCACTTTTATACCTTTTAAATATCTTACTTTAGCCAACTCTCGAATCTCTGATATT
4001 CTTTTTCACATAGCTCAAAATTTTGATCATTAATTTCAATAAAATATATTTCAATAATATTAATAATATTACTTTAATAGTTACTGCTTTTGAACTATT
4101 CAAATTAATGTATTTCTCGTACCTTCATTAAGTATTAGAACTTTCAATATATCTTCACTGGAAGAGCTCTAATTTGTAAGCTCGATACAAAATTTTC
4201 GACACTGGCGCTTTGATAGTTTAGAGCTATGGCTCTGAACCACTCATGAACCGGTTACAGATTTGAAATTTGCGCATGCAATTAAGCAGCATAACTA
4301 GGACATATTCATTGATTTAAATCAACAAAGTTTCAGCTCGCAGACGCTTATAGTTCTTTAAACAAAGCAATGAATAATTTTTCATTACATGCGAACCGG
4401 TTCAAGGATGTGAATGAAACACATAAAAAATGtATCCTGTTAAGCCGTTAACTCAAATTTGAGAGCCACAAGCTGAGCTCTAGCTACCTCTGGCTA
4501 GTGTATATACCTTTCTAACGCTCAGTGCACTGGGTATGGCAATGCAACCAATTAATCGCCCGCGCTGCATTTGGCAAATGTCAACAGGCGCGCAGT
4601 TTCAGTTTCAGTCCAGTTCAATTATTCATTATTCATTCATGAGAGAGAAAGAGTGCCTGCTGAGTGGGCTGTTGTGGGCATTGCGGTTGCGAGC
4701 TCTCCATTGATAAAACGCTTGAAACGCTGCGTGGGAGGATAAGTCTGGCCAGTTGGCTCGAATACGATACGATGCGAAGATCGCATTGGGTAC
4801 GACGGCGATCGGTTTCGAGTTTGGCTTGGCGATATGACAAGACAGCGTGAAGAGCGATGAGATGGAGCGTCAACAGATTTGTATCTGTCTGCCA
4901 TAACGTTGCTGTTTAAATTAAGGTTTATTCGTGTATGTCGCCAGGCGGCTGCTCTAACCCTGATTAACATGTAGATTAATGCCATAAGCAGGCGG
5001 ACCGAGTGAGCGGAGAGACAGAGACAGACAAACAGACAGACAGACAGACACACTTTTGAATGAGTTGTTTAAATCGTTGTGCTCTCTCACGG
5101 GCTGCGATTGTTGCTTATCTTAAAGACTTTTACCTTTGTTACCTTTTGAAGTCCCTAAACCTTTGCCGACCTTGACTGTGGGCTGCGACTGCGTCTGC
5201 TGTTGATCAAACTGAAAGTTGGCCGAAAGAAAAAGGCCAACGCTCATCATCAACGCTTTGGGGTCAGACCACAAAATGTGCCCCGCTTCGGCGTC
5301 CGAACGCTGTCCACTCGTGTGTTTCCACTTGGCAGGTGAGAATTGACAAATTTCCATTTCGCTCAATGTAATCAATAAAACCACTACAGCAGCAGCAACAA
5401 ACAACAACCTCGTATATTTAAACAAAGTAAAGTGATCTATTTGTAGCGCACGACTCGAAGATATCTTGCACACAGCTATGCATACTAACTATAAATCTG
5501 CTTCCAATATACAAAATGTATCTTCAGTAACCTTTTCCAACTCTGAACAACTGTTGTGATGTTATCGGAACATAAATGACATTCAAATTAATGCAGA
5601 GCCGAGGCTTTAAAAAGCGGCTTTACTATCTTAATTTCCGCGTAGCTCTTAAAGTCTCTGAGATATGTAAGTAAAGCAGGAGTGTGTTATCGATAA
5701 TTATCGATTGTAATCAAAATACGAGAATCACCTTTGAAATGCGAAAAAAGCAAAATATATCTTGTATGAGTATCCCATCCAATTCGCTGTTTATAGTT
5801 CCAATAATCGCCGAGATATATTTAAAGAAACCTGGTGGCCACATCGATATTTATCGATCTTTGGCAAATGTGAAATGTATCCAAAATGGAATAATCT
5901 TGATTAGTGATGCTTGTCTTCAAGCTATTGACATATTTGATTTTAAAGATATATATTAATAAATGATGTTTAAATGATATTTATGATTTAGT
6001 ATTAGTATATAGTAAACATATAGTATTAATGCTGAAGCGGATGGTAAGTTTGAATAAATTTGAACTCCATTTGACAAGGAGAGTCAAGTAATTAAT
6101 TCAGTTATTAATATATCTCTGACACATGAATTC

```

Anexo I. Secuencia de la región homóloga del enhancer DC en *D. virilis*. El número de acceso GenBank/EMBL para esta secuencia es AF132809.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, M. C. y Cabrera, C. V. The *achaete-scute* gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. *EMBO J.* **7**, 2585-2591 (1988).
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. y Fortini, M. E. Notch signaling. *Science* **268**, 225-232 (1995).
- Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C. y Kornberg, T. Proteolysis that is inhibited by Hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* **89**, 1043-1053 (1997).
- Baker, N. E. Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. *EMBO J.* **6**, 1765-1773 (1987).
- Baker, N. E. Transcription of the segment-polarity gene *wingless* in the imaginal discs of *Drosophila*, and the phenotype of a pupal-lethal *wg* mutation. *Development* **102**, 489-497 (1988).
- Balcells, L., Modolell, J. y Ruiz-Gómez, M. A unitary basis for different *Hairy-wing* mutations of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **7**, 3899-3906 (1988).
- Bate, M. (1978). Development of sensory systems in Arthropods. Handbook of sensory physiology. Springer-Verlag.
- Bate, M. y Martínez-Arias, A. The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* **112**, 755-761 (1991).
- Beamonte, D. Búsqueda y caracterización de genes homólogos a los del complejo *achaete-scute* de *Drosophila melanogaster*. Ph.D. Thesis Universidad Autónoma de Madrid, (1990).
- Beverly, M. D. y Wilson, A. C. Molecular evolution in *Drosophila* and higher Diptera. II. A time scale for fly evolution. *J. Mol. Evol.* **21**, 1-13 (1984).
- Blair, S. S. *engrailed* expression in the anterior lineage compartment of the developing wing blade of *Drosophila*. *Development* **115**, 21-33 (1992).
- Blair, S. S. Compartments and appendage development in *Drosophila*. *BioEssays* **17**, 299-309 (1995).
- Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. y Zavortink, M. The role of *apterous* in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* **120**, 1805-1815 (1994).
- Bodmer, R., Carretto, R. y Jan, Y. N. Neurogenesis of the peripheral nervous system in *Drosophila* embryos: DNA replication patterns and cell lineages. *Neuron* **3**, 21-32 (1989).
- Brand, A. H. y Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415 (1993).
- Brand, M., Jarman, A. P., Jan, L. Y. y Jan, Y. N. *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* **119**, 1-17 (1993).
- Brook, W. J. y Cohen, M. Antagonistic interactions between *wingless* and *decapentaplegic* responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* leg. *Science* **273**, 1373-1377 (1996).
- Brown, J. L. y Wu, C. Repression of *Drosophila* pair-rule segmentation genes by ectopic expression of *tramtrack*. *Development* **117**, 45-58 (1993).
- Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L. y Basler, K. *pangolin* encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* **385**, 829-833 (1997).
- Cabrera, C. V. y Alonso, M. C. Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete-scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila*. *EMBO J.* **10**, 2965-2973 (1991).
- Cadigan, K. M., Fish, M. P., Rulifson, E. J. y Nusse, R. Wingless repression of *Drosophila* frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell* **93**, 767-777 (1998).
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. y Morata, G. Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-255 (1996).
- Campuzano, S., Balcells, L., Villares, R., Carramolino, L., García-Alonso, L. y Modolell, J. Excess function *Hairy-wing* mutations caused by *gypsy* and *copa* insertions within structural genes of the *achaete-scute* locus of *Drosophila*. *Cell* **44**, 303-312 (1986).
- Campuzano, S., Carramolino, L., Cabrera, C. V., Ruiz-Gómez, M., Villares, R., Boronat, A. y Modolell, J. Molecular genetics of the *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*. *Cell* **40**, 327-338 (1985).

- Campuzano, S. y Modolell, J. Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends Genet.* **8**, 202-207 (1992).
- Capdevila, J. y Guerrero, I. Targeted expression of the signal molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J.* **13**, 4459-4468 (1994).
- Carramolino, L., Ruiz-Gómez, M., Guerrero, M. C., Campuzano, S. y Modolell, J. DNA map of mutations at the *scute* locus of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **1**, 1185-1191 (1982).
- Caudy, M., Vassin, H., Brand, M., Tuma, R., Jan, L. Y. y Jan, Y. N. *daughterless*, a *Drosophila* gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to myc and the *achaete-scute* complex. *Cell* **55**, 1061-1067 (1988).
- Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. y Cohen, S. M. *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev.* **6**, 715-729 (1992).
- Cohen, B., Simcox, A. A. y Cohen, S. M. Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* **117**, 597-608 (1993).
- Couso, J. P., Bate, M. y Martínez-Arias, A. A *wingless*-dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs. *Science* **259**, 484-489 (1993).
- Couso, J. P., Bishop, S. A. y Martínez-Arias, A. The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*. *Development* **120**, 621-636 (1994).
- Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S. y Modolell, J. Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* **5**, 996-1008 (1991).
- Cubbada, Y., Heitzler, P., Ray, R. P., Bourouis, M., Romain, P., Gelbart, W., Simpson, P. y Haenlin, M. *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during formation of bristles in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 3083-3095 (1997).
- Culí, J. y Modolell, J. Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by *Notch* signaling. *Genes Dev.* **12**, 2036-2047 (1998).
- Dambly-Chaudière, C. y Leyns, L. The determination of sense organs in *Drosophila*: a search for interacting genes. *Int. J. Dev. Biol.* **36**, 85-91 (1992).
- Davidson, E. H. Later embryogenesis: regulatory circuitry in morphogenetic fields. *Development* **118**, 665-690 (1993).
- de Celis, J. F., Barrio, R. y Kafatos, F. C. A gene complex acting downstream of *dpp* in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* **381**, 421-424 (1996).
- Devereux, J., Haeverli, P. y Smithies, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nuc. Acids Res.* **12**, 387-395 (1984).
- Díaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-752 (1993).
- Díaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M. Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorso-ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 4215-4225 (1995).
- Díez del Corral, R. (1998). El complejo Iroquois interviene en la formación del notum y de las venas del ala de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Domínguez, M. y Campuzano, S. *asense*, a member of the *Drosophila* *achaete-scute* complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J.* **12**, 2049-2060 (1993).
- Duboule, D. y Wilkins, A. S. The evolution of "bricolage". *TIG* **14**, 54-59 (1998).
- Ephrussi, A., Church, G. M., Tonegawa, S. y Gilbert, W. B lineage-specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *science* **277**, 134-140 (1985).
- Evans, T. y Felsenfeld, G. Trans-activation of a globin promoter in nonerythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 843-853 (1991).
- Evans, T., Reitman, M. y Felsenfeld, G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5976-5980 (1988).
- Florence, B., Guichet, A., Ephrussi, A. y Laughon, A. Ftz-F1 is a cofactor in Ftz activation of the *Drosophila engrailed* gene. *Development* **124**, 839-847 (1997).
- García-Alonso, L. y García-Bellido, A. Genetic analysis of the *hairy-wing* mutations. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **195**, 259-264 (1986).

- García-Bellido, A. Genetic analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **91**, 491-520 (1979).
- García-Bellido, A. (1981). From the gene to the pattern: chaete differentiation. Cellular controls in differentiation. C. D. Lloyd and D. A. Rees. New York, Academic Press. 281-301
- García-Bellido, A. (1983). Comparative anatomy of cuticular patterns in the genus *Drosophila*. Development and Evolution. Cambridge University Press.
- García-Bellido, A., Ripoll, P. y Morata, G. Developmental compartmentalisation of the wing disc of *Drosophila*. *Nature New Biol.* **245**, 251-253 (1973).
- García-Bellido, A., Ripoll, P. y Morata, G. Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **48**, 132-147 (1976).
- García-Bellido, A. y Santamaría, P. Developmental analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **88**, 469-486 (1978).
- Ghysen, A. y Dambly-Chaudière, C. Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet.* **5**, 251-255 (1989).
- Ghysen, A. y Dambly-Chaudière, C. The specification of sensory neuron identity in *Drosophila*. *BioEssays* **15**, 293-298 (1993).
- Ghysen, A. y Richelle, J. Determination of sensory bristles pattern formation in *Drosophila*. II The *achaete-scute* locus. *Developmental Biology* **70**, 438-452 (1979).
- Golic, K. G. y Lindquist, S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499-509 (1989).
- Gómez-Skarmeta, J. L., Díez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferrés-Marcó, D. y Modolell, J. *araucan* and *caupolican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. *Cell* **85**, 95-105 (1996).
- Gómez-Skarmeta, J. L. y Modolell, J. *araucan* and *caupolican* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* **10**, 2935-2946 (1996).
- Gómez-Skarmeta, J. L., Rodríguez, I., Martínez, C., Culi, J., Ferrés-Marcó, M. D., Beamonte, D. y Modolell, J. Cis-regulation of *achaete* and *scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev.* **9**, 1869-1882 (1995).
- González, F., Romani, S., Cubas, P., Modolell, J. y Campuzano, S. Molecular analysis of the *asense* gene, a member of the *achaete-scute* complex of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *EMBO J.* **8**, 3553-3562 (1989).
- González-Gaitán, M., Capdevila, M. P. y García-Bellido, A. Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **40**, 183-200 (1994).
- Grimm, S. y Pflugfelder, G. O. Control of the gene *optomotor-blind* in *Drosophila* wing development by *decapentaplegic* and *wingless*. *Science* **271**, 1601-1604 (1996).
- Guo, M., Jan, L. Y. y Jan, Y. N. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* **17**, 27-41 (1996).
- Haenlin, M., Cubbada, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P. y Romain, P. Transcriptional activity of Pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the *u-shaped* gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 3096-3108 (1997).
- Harrison, S. D. y Travers, A. The *tramtrack* gene encodes a *Drosophila* finger protein that interacts with the *ftz* transcriptional regulatory region and shows a novel expression pattern. *EMBO J.* **9**, 207-216 (1990).
- Hartenstein, V. y Posakony, J. W. Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* **107**, 389-405 (1989).
- Heitzler, P., Haenlin, M., Romain, P., Calleja, M. y Simpson, P. A genetic analysis of *pannier*, a gene necessary for viability of dorsal tissues and bristle positioning in *Drosophila*. *Genetics* **143**, 1271-1287 (1996).
- Hiromi, Y. y Gehring, W. J. Regulation and function of the *Drosophila* segmentation gene *fushi tarazu*. *Cell* **50**, 963-974 (1987).
- Huang, F., Dambly-Chaudière, C. y Ghysen, A. The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* **111**, 1087-1095 (1991).
- Ingham, P. W. Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.* **17**, 3505-3511 (1998).
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Bier, E. y Levine, M. The *dorsal* gradient morphogen regulates stripes of *rhomboid* expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **6**, 1728-1739 (1992).

- Jacob, F. Evolution and tinkering. *Science* **196**, 1161-1166 (1977).
- Jiménez, F. y Campos-Ortega, J. A. On a region of the *Drosophila* genome necessary for central nervous system development. *Nature* **282**, 310-312 (1979).
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. y Kluding, H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* II Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 283-295 (1984).
- Kalionis, B. (1995). Gene isolation by screening λ gt11 expression libraries with DNA binding site probes. In vitro transcription and translation protocols. M. J. Timms. New Jersey, Humana Press. 393-407
- Kim, J., Irvine, K. D. y Carroll, S. B. Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorso-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell* **82**, 795-802 (1995).
- Kim, J., Johnson, K., Chen, H. J., Carroll, S. y Laughon, A. *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**, 304-308 (1997).
- Klingensmith, J., Nusse, R. y Perrimon, N. The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the *wingless* signal. *Genes Dev.* **8**, 118-130 (1994).
- Knust, E., Schrons, H., Grawe, F. y Campos-Ortega, J. A. Seven genes of the *Enhancer of split* complex of *Drosophila melanogaster* encode helix-loop-helix proteins. *Genetics* **132**, 505-518 (1992).
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. y Simon, M. The *engrailed* locus of *Drosophila*: In situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* **40**, 45-53 (1985).
- Langeland, J. A. y Carroll, S. B. Conservation of regulatory elements controlling *hairy* pair-rule stripe formation. *Development* **117**, 585-596 (1993).
- Lawrence, P. A., Bodmer, R. y Vincent, J. P. Segmental patterning of heart precursors in *Drosophila*. *Development* **121**, 4303-4308 (1995).
- Lawrence, P. A. y Struhl, G. Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*? *Cell* **85**, 951-961 (1996).
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. y Cohen, S. M. Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387-393 (1996).
- Letsou, A., Arora, K., Wrana, J. L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Gelbart, W. M., Massagué, J. y O'Connor, M. B. *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the *punt* gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF β receptor family. *Cell* **80**, 899-908 (1995).
- Leys, L., Dambly-Chaudière, C. y Ghysen, A. Two different sets of cis elements regulate *scute* to establish two different sensory patterns. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**, 227-232 (1989).
- Leys, L., Gómez-Skarmeta, J. L. y Dambly-Chaudière, C. *iroquois*: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **59**, 63-72 (1996).
- Lindsley, D. L. y Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, USA.
- Martín-Bermudo, M. D., Carmena, A. y Jiménez, F. Neurogenic genes control gene expression at the transcriptional level in early neurogenesis and in mesectoderm specification. *Development* **121**, 219-224 (1995).
- Martínez, C. y Modolell, J. Cross-regulatory interactions between the proneural *achaete* and *scute* genes of *Drosophila*. *Science* **251**, 1485-1487 (1991).
- Martínez-Arias, A. (1993). Development and patterning of the larval epidermis of *Drosophila*. The Development of *Drosophila melanogaster*. M. Bate and A. Martínez-Arias. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. I: 517-608
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. y Simon, M. A. *mirror* encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorso-ventral border of the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* **11**, 1073-1082 (1997).
- Meinhardt, H. Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. *Dev. Biol.* **96**, 375-385 (1983).
- Méthod, N. y Basler, K. Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus. *Cell* **96**, 819-831 (1999).
- Misra, S. y Rio, D. C. Cytotype control of *Drosophila* P element transposition: the 66 kd protein is a repressor of transposase activity. *Cell* **62**, 269-284 (1990).

- Mlodzik, M., Baker, N. E. y Rubin, G. M. Isolation and expression of *scabrous*, a gene regulating neurogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev.* **4**, 1848-1861 (1990).
- Modolell, J. y Campuzano, S. The *achaete-scute* complex as an integrating device. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 275-282 (1998).
- Morata, G. y Lawrence, P. A. Control of compartment development by the *engrailed* gene in *Drosophila*. *Nature* **255**, 614-617 (1975).
- Morimura, S., Maves, L., Chen, Y. y Hoffman, F. M. *decapentaplegic* overexpression affects *Drosophila* wing and leg imaginal disc development and *wingless* expression. *Dev. Bio.* **177**, 136-151 (1996).
- Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J. y Guerrero, I. Hedgehog activity, independent of Decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* **124**, 1227-1237 (1997).
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V. y Baltimore, D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537-544 (1989).
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. y Basler, K. Direct and long-range action of DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-368 (1996).
- Neumann, C. J. y Cohen, S. M. Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 871-880 (1997).
- Nusse, R. y Varmus, H. E. *Wnt* genes. *Cell* **69**, 1073-1087 (1992).
- Oellers, N., Dehio, M. y Knust, E. bHLH proteins encoded by the *Enhancer of split* complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 465-473 (1994).
- Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. y Caudy, M. hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev.* **8**, 2743-2755 (1994).
- Orsulic, S. y Peifer, M. Cell-cell signalling: Wingless lands at last. *Curr. Biol.* **6**, 1363-1367 (1996).
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. y Irvine, K. D. Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-912 (1997).
- Phillips, R. G. y Whittle, J. R. S. *wingless* expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of *Drosophila* wing disc development. *Development* **118**, 427-438 (1993).
- Preiss, A., Hartley, D. A. y Artavanis-Tsakonas, S. The molecular genetics of *enhancer of split*, a gene required for embryonic neural development in *Drosophila*. *The EMBO Journal* **7**, 3917-3927 (1988).
- Ramaekers, G., Usui, K., Usui-Ishihara, A., Ramaekers, A., Ledent, V., Ghysen, A. y Dambly-Chaudière, C. Lineage and fate in *Drosophila*: role of the gene *tramtrack* in sense organ development. *Dev. Genes. Evol.* **207**, 97-106 (1997).
- Ramain, P., Heitzler, P., Haenlin, M. y Simpson, P. *pannier*, a negative regulator of *achaete* and *scute* in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development* **119**, 1277-1291 (1993).
- Read, D. y Manley, J. L. Alternatively spliced transcripts of the *Drosophila* *tramtrack* gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities. *EMBO J.* **11**, 1035-1044 (1992).
- Riese, J., Yu, X., Munnerlyn, A., Eresh, S., Hsu, S. C., Grosschedl, R. y Bienz, M. LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from *wingless* and *decapentaplegic*. *Cell* **88**, 777-787 (1997).
- Roberts, D. B. (1986). Basic *Drosophila* care and techniques. *Drosophila. A practical approach*. D. B. Roberts. Oxford, IRL Press Limited.
- Rodríguez, I., Hernández, R., Modolell, J. y Ruiz-Gómez, M. Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *EMBO J.* **9**, 3583-3592 (1990).
- Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E. y Modolell, J. Expression of *achaete* and *scute* genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev.* **3**, 997-1007 (1989).
- Romani, S., Campuzano, S. y Modolell, J. The *achaete-scute* complex is expressed in neurogenic regions of *Drosophila* embryos. *EMBO J.* **6**, 2085-2092 (1987).
- Rubin, G. M. y Spradling, A. C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353 (1982).
- Ruiz-Gómez, M. y Modolell, J. Deletion analysis of the *achaete-scute* locus of *D. melanogaster*. *Genes Dev.* **1**, 1238-1246 (1987).
- Rulifson, E. J. y Blair, S. S. *Notch* regulates *wingless* expression and is not required for reception of the paracrine *wingless* signal during wing margin neurogenesis in *Drosophila*. *Development* **121**, 2813-2824 (1995).

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S. y Gelbart, W. M. Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of *decapentaplegic* and *patched* expression by *engrailed*. *Genetic* **139**, 754-756 (1995).
- Sato, M., Kojima, T., Michiue, T. y Saigo, K. *Bar* homeobox genes are latitudinal prepattern genes in the developing *Drosophila* notum whose expression is regulated by the concerted functions of *decapentaplegic* and *wingless*. *Development* **126**, 1457-1466 (1999).
- Schröder, C., Tautz, D., Seifert, E. y Jackle, H. Differential regulation of the two transcripts from the *Drosophila* gap segmentation gene *hunchback*. *EMBO J.* **7**, 2881-2887 (1988).
- Simpson, P. Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Development* **109**, 509-519 (1990).
- Simpson, P. *Drosophila* development: a prepattern for sensory organs. *Current Biol.* **6**, 948-950 (1996).
- Singh, H., LeBowitz, J. H., AS Baldwin, J. y Sharp, P. A. Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell* **52**, 415-423 (1988).
- Singson, A., Leviten, M. W., Bang, A. G., Hua, X. H. y Posakony, J. W. Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibition signaling. *Genes Dev.* **8**, 2058-2071 (1994).
- Skeath, J. B. y Carroll, S. B. Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* **5**, 984-995 (1991).
- Smith, D. B. y Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene* **67**, 31-40 (1988).
- Staehling-Hampton, K., Jackson, P. D., Clark, M. J., Brand, A. H. y Hoffmann, F. M. Specificity of bone morphogenetic protein related factors: cell fate and gene expression changes in *Drosophila* embryos by *decapentaplegic* but not *60A*. *Cell Growth Differ.* **5**, 585-593 (1994).
- Stern, C. Two or three bristles. *American Scientist* **42**, 213-247 (1954).
- Struhl, G. y Basler, K. Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527-540 (1993).
- Tabata, T. y Kornberg, T. B. Hedgehog is a signalling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **76**, 89-102 (1994).
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. y Kornberg, T. B. Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of *engrailed*, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-3369 (1995).
- Tautz, D. y Pfeifle, C. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* **98**, 81-85 (1989).
- Tomoyasu, Y., Nakamura, M. y Ueno, N. Role of Dpp signalling in prepattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. *Development* **125**, 4215-4224 (1998).
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ympa, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M. y Clevers, H. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene *dTCF*. *Cell* **88**, 789-799 (1997).
- Van Doren, M., Powell, P. A., Pasternak, D., Singson, A. y Posakony, J. W. Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross- activation of *achaete* is antagonized by *extramacrochaetae*. *Genes Dev.* **6**, 2592-2605 (1992).
- Villares, R. y Cabrera, C. V. The *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc. *Cell* **50**, 415-424 (1987).
- Winick, J., Abel, T., Leonard, M. W., Michelson, A. M., Chardon-Loriaux, I., Holmgren, R. A., Maniatis, T. y Engel, J. D. A GATA factor transcription factor is expressed along the embryonic dorsoventral axis in *Drosophila melanogaster*. *Development* **119**, 1055-1065 (1993).
- Xu, T. y Rubin, G. M. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237 (1993).
- Zecca, M., Basler, K. y Struhl, G. Sequential organizing activities of *engrailed*, *hedgehog* and *decapentaplegic* in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-2278 (1995).
- Zecca, M., Basler, K. y Struhl, G. Direct and long range action of a Wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-844 (1996).
- Zinn, K., McAllister, L. y Goodman, C. S. Sequence analysis and neuronal expression of Fascilin I in Grasshopper and *Drosophila*. *Cell* **53**, 577-587 (1988).

Reunido el tribunal que preside el Sr. D. de la fecha, acordó por unanimidad declarar por sobesahiente y la de — por unanimidad
MADRID, 17 de Junio 1888